

Die Primärstruktur der menschlichen Kininogene

Josef Kellermann

Disbui. München

1989

Die Primärstruktur der menschlichen Kininogene

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät der Biologie

der

Ludwig - Maximilians - Universität

München

vorgelegt von Josef Kellermann

aus Rohrbach

Januar 1989

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. habil. H.-J. SCHNEIDER
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. habil. W. SCHARTAU
Sonderberichterstatter: Dr. F. LOTTSPETCH

Tag der mündlichen Prüfung: 17.7.1989

Danksgiving

Das Thanksgiving ist eine der wichtigsten Feiern in den Vereinigten Staaten. Es wird am vierten Donnerstag im Oktober gefeiert. In diesem Jahr fällt es am 27. Oktober an.

Die Ursprünge des Thanksgiving liegen in der Geschichte der Pilgerväter, die 1620 auf der Mayflower nach Amerika kamen. Sie wurden von den amerikanischen Indianern unterstützt.

Heute wird Thanksgiving als Tag der Dankbarkeit gefeiert. Die Menschen danken für die Ernte und die vielen Segnungen des Lebens. Es ist eine Zeit der Zusammenkunft mit Familie und Freunden.

Meinen Eltern

Meine Eltern sind die besten Menschen, die ich kenne. Sie haben mich großgezogen und mich gelehrt, ein guter Mensch zu sein. Ich danke euch sehr für alles, was ihr für mich getan habt.

Ihr seid meine Vorbilder und ich möchte euch nachahmen. Ich danke euch für eure Liebe und eure Unterstützung. Ich liebe euch sehr.

Ich hoffe, ich werde euch bald wieder sehen. Bis dahin bleibe ich gesund und glücklich. Ich danke euch noch einmal für alles.

Ich liebe euch sehr und danke euch für alles, was ihr für mich getan habt. Ich danke euch sehr.

Ich danke euch sehr für alles, was ihr für mich getan habt. Ich danke euch sehr.

Ich danke euch sehr für alles, was ihr für mich getan habt. Ich danke euch sehr.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Herrn Dr. Friedrich LOTTSPEICH durchgeführt.

Ich möchte ihm dafür und besonders für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit herzlichst danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Agnes HENSCHEN für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für ihre stete Bereitschaft zu anregenden Diskussionen.

Mein Dank gilt Priv. Doz. Dr. Hans-Jürgen SCHNEIDER, der sich nach dem Ableben von Prof. Dr. Bernt LINZEN bereit erklärt hat, die vorliegende Arbeit vor der Fakultät zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Werner MÜLLER-ESTERL danke ich für gute Zusammenarbeit, die anregenden Gespräche und seine Diskussionsbereitschaft.

Frau Christiane THELEN danke ich besonders herzlich für ihre qualifizierte experimentelle Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Ich bedauere zutiefst den plötzlichen Tod von Herrn Prof. Dr. Bernt LINZEN, den ich sowohl als Lehrer als auch als Mensch ausserordentlich geschätzt habe.

Ich danke ihm für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit, die er mit großem Interesse verfolgt hat, vor der zoologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität zu vertreten.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Historischer Überblick	1
2. Stand der Forschung	4
2.1. Struktur der Kininogene	4
2.2. Funktion der Kininogene	6
Material und Methoden	9
1. Material	9
2. Isolierung	11
3. Proteinmodifikationen	12
3.1. Reduktion und Alkylierung	12
3.2. Oxidation der Disulfidbrücken	12
3.3. Citraconylierung und Spaltung der Arginylbindungen	13
4. Spaltungen von Peptidbindungen	13
4.1. Spaltung der Methionyl-Bindungen mit Bromcyan	13
4.2. Spaltung mit Hydroxylamin	13
4.3. Spaltung mit N-Chlorsuccinimid	14
4.4. Spaltung mit N-Bromsuccinimid	14
4.5. Spaltung mit Gewebskallikrein	14
4.6. Spaltung mit Plasmakallikrein	15
4.7. Spaltung mit Trypsin	15
4.8. Spaltung mit V8 Protease	16
4.9. Spaltung mit Thermolysin	16
4.10. Spaltung mit Pyroglutamat-aminopeptidase	16
4.11. Spaltung mit Carboxypeptidase Y	17
5. Abspaltung der O-glycosidisch gebundenen Kohlenhydrate mit Flußsäure	17
6. Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
7. Chromatographiemethoden	18
7.1. Entsalzungen	18
7.2. Gelfiltration	18
7.3. Reversed Phase HPLC	19
7.4. Ionenaustauscher	19

8.	Aminosäurenanalyse	20
9.	Bestimmung Disulfidhaltiger Fraktionen	20
10.	Sequenzanalysen	20
10.1.	Manuelle N-terminale Aminosäuresequenzanalyse	20
10.2.	Automatische N-terminale Sequenzanalyse	21
11.	Computerprogramme	23
11.1.	Search	23
11.2.	Relate	23
11.3.	Theoretische Berechnung der Sekundärstruktur	24
11.4.	Berechnung der Hydrophilizität	25

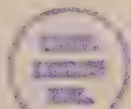
Ergebnisse

1.	Strukturaufklärung des hochmolekularen Kininogens	26
1.1.	Strukturaufklärung der schweren Kette des hochmolekularen Kininogens	28
1.1.1.	Spaltung der schweren Kette mit Bromcyan	29
1.1.2.	Spaltung der schweren Kette mit Trypsin nach Blockierung der Lysinreste	30
1.1.3.	Spaltung der schweren Kette mit Trypsin	32
1.1.4.	Spaltung der schweren Kette mit <i>Staphylococcus aureus</i> Protease V8 (an Glutaminsäureresten)	35
1.1.5.	Spaltung der schweren Kette mit N-Chlorsuccinimid	37
1.1.6.	Spaltung der schweren Kette mit <i>Staphylococcus aureus</i> Protease V8	38
1.2.	Strukturaufklärung der leichten Kette des hochmolekularen Kininogens	42
1.2.1.	Spaltung der leichten Kette mit Bromcyan	42
1.2.2.	Charakterisierung von Fragment CB 1	44
1.2.3.	Trypsinspaltung von Peptid CB 1	45
1.2.4.	Spaltung von Fragment CB 1 mit Trypsin nach Blockierung der Lysinreste durch Citraconsäureanhydrid	48

1.2.5.	Thermolysinspaltung des Bromcyanpeptids CB 1	49
1.2.6.	Spaltung mit <i>Staphylococcus aureus</i> V8 Protease	52
1.2.7.	Spaltung mit Hydroxylamin	55
1.2.8.	Charakterisierung des Bromcyan-Peptids CB 2	56
1.2.9.	Charakterisierung der Bromcyanpeptide CB 3 und CB 4	56
1.2.10.	Säurespaltung	57
1.2.11.	Hydroxylamin-Spaltung	58
1.2.12.	Trypsin-Spaltung	58
1.2.13.	Charakterisierung des Bromcyanpeptids CB 5	59
1.2.14.	Verknüpfung der Bromcyanpeptide CB 1, CB 3/4 und CB 5	60
2.	Strukturaufklärung des niedermolekularen Kininogens	64
2.1.	Sequenzierung der leichten Kette des nieder- molekularen Kininogens	67
2.2.	Charakterisierung der schweren Kette und Auf- klärung der Lage der Disulfidbrücken im niedermolekularen Kininogen	70

Diskussion

1.	Sequenzierungsstrategie	77
2.	Charakteristika der Primärstruktur des humanen hochmolekularen Kininogens	78
3.	Charakteristika der Primärstruktur des humanen niedermolekularen Kininogens	80
4.	Interne Homologien der schweren Ketten der Kininogene	82
5.	Interne Homologien der leichten Kette des hoch- molekularen Kininogens	84



6.	Vergleich von humanem und bovinem hochmolekularen Kininogen	87
7.	Homologie mit anderen Proteinen	89
8.	Modell zur Evolution von Cysteinproteinase Inhibitoren	92
9.	Charakteristika der Disulfidbrücken der Kininogene	94
10.	Vergleich der Disulfidbrücken der 3 Familien von Cysteinproteinase Inhibitoren	96
11.	Strukturelle Organisation der Kininogene	98
Ausblick		100
Zusammenfassung		101
Literaturverzeichnis		105

Abkürzungen

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
SCM-C	SCM-Cys	S-Carboxymethylcystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
HSer		Homoserin
Z		Pyroglutaminsäure
X		nicht identifizierte Aminosäure
GluNAc		N-Acetylglucosamin
GalNAc		N-Acetylgalactosamin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	
CNBr	Bromcyan	
DABITC	4-N,N-Dimethylaminoazobenzol 4-isothiocyanat	
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	
OPA	ortho-Phthaldialdehyd	
PITC	Phenylisothiocyanat	
PTC	Phenylthiocarbamyl	

PTH	3-Phenyl-2-Thiohydantoin
Quadrol	N,N,N',N'-Tetrakis(2-Hydroxypropyl)-Äthylendiamin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethan-Keton
TFA	Trifluoressigsäure
HMWK	high-molecular-weight kininogen, hochmolekulares Kininogen
LMWK	low-molecular-weight kininogen, niedermolekulares Kininogen
Peptide aus Spaltungen mit:	
CB	Bromcyan
T	Trypsin
TL	Thermolysin
CT	Trypsin nach Citraconylierung
HA	Hydroxylamin
NCS	N-Chlor-succinimid
NBS	N-Brom-succinimid
E	<i>Staphylococcus Aureus</i> Protease V8

Einleitung

Das Kallikrein-Kinin-System

Zur Regulation physiologischer Funktionsabläufe bedient sich der Organismus sowohl nervaler als auch humoraler Steuerungsmechanismen. Zu diesen humoralen Regelmechanismen kann auch die Steuerung biologischer Prozesse durch proteolytische Systeme (Neurath u. Walsh, 1976) gezählt werden. Solche Systeme bestehen im einfachsten Fall aus drei Komponenten, nämlich einem Enzym, das, reguliert durch einen Inhibitor, auf sein Substrat einwirkt (Holzer u. Heinrich, 1980). Der Effektor dieses Systems kann zum einen das aktivierte Substrat selbst sein oder es können aktive Peptide aus dem Substrat herausgespalten werden, die ihrerseits zum Effektor werden.

Die hierarchische Verknüpfung solcher proteolytischer Systeme führt bei Vertebraten zur Bildung von Reaktionskaskaden (Davie u. Fujikawa, 1975), die verschiedene Regelmechanismen verbinden oder auch physiologische Signale verstärken können (z.B. Blutgerinnung (Davie et al., 1979) und Fibrinolyse (Wiman u. Collen, 1978))

Das Kallikrein-Kinin System ist ein Beispiel eines solchen proteolytischen Systems. Kallikrein setzt dabei aus einem großen Vorläufermolekül, dem Kininogen, vasoaktive Peptide (Kinine) frei. Die ersten Arbeiten auf diesem Gebiet wurden 1923 von Emil Frey, Heinrich Kraut und Eugen Werle (Frey et al., 1968) an der Münchner Chirurgischen Universitätsklinik durchgeführt.

1. Historischer Überblick

Die Aufklärung des Kallikrein-Kinin Systems begann in den Jahren zwischen 1923 und 1936 mit Studien über die Wirkung von intravenösen Harninjektionen auf den Kreislauf. Frey beobachtete bei einem narkotisierten Hund, dem er wenige

Milliliter Harn injiziert hatte, einen Anstieg der Pulsrate und ein gleichzeitiges Absinken des Blutdruckes. Nach wenigen Minuten konnte der Versuch mit den gleichen Effekten wiederholt werden. Wurde der Harn jedoch kurz aufgekocht, unterblieb die beschriebene Wirkung. *Kraut, Frey und Werle* isolierten daraufhin aus dem Harn eine Substanz mit der beschriebenen Wirkung. Als sie wenig später die gleiche Substanz in weit höheren Konzentrationen im Pankreas vorfanden und der Pankreas somit als Ort der Synthese angenommen wurde, benannten sie diese Substanz Kallikrein (Pankreas= griech. Kallikreas).

Der erste Kallikrein-Inhibitor wurde postuliert, als nach Injektion einer bluthaltigen Harnprobe die beschriebene Wirkung auf den Kreislauf ausblieb, die Probe jedoch nach Ansäuern des Harns, wie oben beschrieben wirksam wurde (*Kraut et al., 1930*).

Aus diesen Beobachtungen, nämlich der Aktivierung der Harnprobe durch Ansäuern, gewannen *Kraut, Frey und Werle* folgende Vorstellung: Kallikrein zirkuliert im Blut gemeinsam mit seinem Inhibitor und entfaltet seine Wirkung durch geringe pH-Verschiebungen, wie sie in unterschiedlichen Organen auftreten.

1936 untersuchte *Werle* die Wirkung von Kallikrein am isolierten Hundedarm (*Werle, 1936*). Er konnte eine langanhaltende Kontraktion feststellen, die sich bei Vorinkubation des Kallikreins mit Serum noch verstärkte. Er schloß daraus, daß nicht Kallikrein die Wirksubstanz sein konnte, sondern daß Kallikrein aus einer im Serum befindlichen inaktiven Vorläufersubstanz Etwas freizusetzen vermag, das die beschriebene Wirkung verursacht (*Werle et al., 1937*). Er nannte diese Substanz Kallidin (*Werle, 1948*) und seine inaktive Vorstufe Kallidinogen.

Nachdem in den darauffolgenden Jahren *Rocha e Silva* (1949) mit Trypsin und Schlangengift aus Serum eine Substanz mit ähnlicher pharmakologischer Wirkung freisetzen konnte, faßte man diese Gruppe aktiver Substanzen unter der Bezeichnung "Kinine" (*Lewis, 1958; Webster et al., 1966*) zusammen. Ihre

unwirksamen Vorstufen wurden als "Kininogene" bezeichnet. Die kininabbauenden Enzyme erhielten den Namen "Kininasen".

Das daraus entwickelte Modell des Kallikrein-Kinin Systems (Abb. 1) ordnet den Kininen als terminalen Effektoren eine zentrale Rolle zu. Die Kinine sind Oligopeptide (9-11 Aminosäuren), die aus hochmolekularen Vorstufen, den Kininogenen, durch limitierte Proteolyse mit Kallikrein freigesetzt werden (Erdös, 1979).

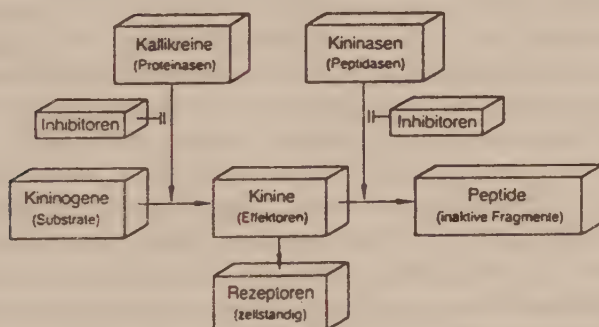


Abb. 1: Schematische Darstellung des Kallikrein-Kininogen Systems, das über das Kinin mit dem Kininase-Kinin System verbunden ist.

Die Kinine üben eine Reihe vasoaktiver Wirkungen aus, wie Erweiterung von Arteriolen (de Freitas et al., 1964), Verengung postkapillarer Venolen und Permeabilitätssteigerung der Gefäßwandungen (Johnson, 1979 und Unterberg, 1984). Ausserdem wirken die Kinine kontrahierend auf glatte Muskulatur von Uterus, Ileum und Bronchien (Regoli und Barabe, 1980). Wicklmayer (1979) beschreibt weiterhin eine Erhöhung der zellulären Glucoseaufnahme und Schill et al. (1979) eine Stimulierung der Spermienmotilität.

Um eine örtliche und zeitliche Begrenzung der Wirkung der Kinine zu gewährleisten, fungieren Kininasen als

Kinin-abbauende Enzyme (Erdös et al., 1976). Es wurden 2 Haupttypen von Kininasen beschrieben, Kininase I (Carboxypeptidase N) und Kininase II (Peptidyldipeptidase oder auch Angiotensin konvertierendes Enzym) (Erdös, 1979). Kininase II inaktiviert das gefäßerweiternde Kinin durch C-terminales Abspalten von Dipeptiden und aktiviert gleichzeitig die Freisetzung von Angiotensin, das gefäßverengend wirkt (Erdös et al., 1979).

Lange Zeit galt das Kallikrein-Kinin System als Regelmechanismus zur Kininfreisetzung. Erst Jahre später fand man, daß auch die Kinin-Vorläufermoleküle, die Kininogene regulierend in biologische Prozesse eingreifen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der endogenen Blutgerinnungskaskade (Griffin und Cochrane, 1976). Hochmolekulares Kininogen dient dabei als Assemblierungsfaktor für Plasmaprokallikrein, Faktor XI und Faktor XII. Diese Funktion der Kininogene als "Steuerungselement" der endogenen Blutgerinnung rückte die Kininogene in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt der Forschungsarbeiten über das Kallikrein-Kinin System.

2. Stand der Forschung

2.1. Struktur der Kininogene

Kininogene sind einkettige Glycoproteine, die in der Leber synthetisiert und dann ins Plasma abgegeben werden (Borges u. Gordon, 1976). Beim Menschen und bei anderen Vertebraten (Rind, Ratte, Kaninchen) findet man zwei Typen von Kininogenen (Jacobson, 1966), die wegen ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes als hochmolekulares (HMW) und niedermolekulares (LMW) Kininogen bezeichnet werden (Kato et al., 1981). Bei der Ratte findet man außerdem noch ein drittes Kininogen, das als T-Kininogen bezeichnet wird (Barlas et al., 1985). Alle Kininogene besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau (Abb. 2).

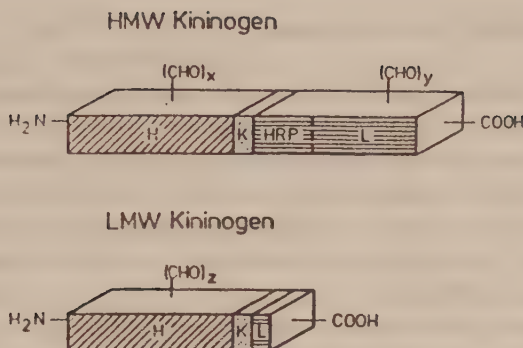


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Kininogene: K, Kinin; H, schwere Kette; L, leichte Kette; HRP, Histidinreiches Peptid; CHO, Kohlenhydratseitenkette.

Sie sind aus einer schweren Kette (H), einer leichten Kette (L) und dem Kinin-Fragment (K) aufgebaut. Durch limitierte Proteolyse können Plasmakallikrein oder Trypsin das Nonapeptid Bradykinin freisetzen (Abb. 3). Gewebeskallikrein hingegen spaltet aus Kininogenen das Dekapeptid Lysyl-Bradykinin heraus. Gemeinsam mit Pepsin kann Kallikrein auch Methionyl-Lysyl-Bradykinin freisetzen. Leichte und schwere Kette bleiben dabei über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Kerberiou und Griffin, 1979).

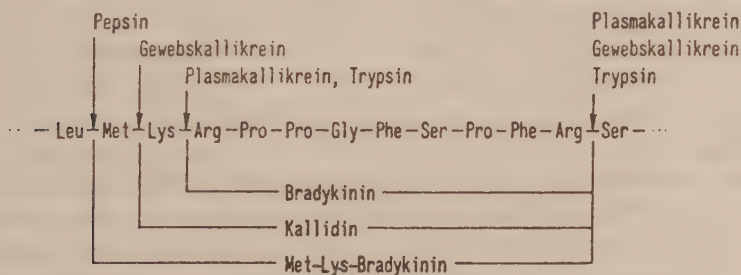


Abb.3: Spaltstellen für Kininogenasen in Kininogenen

2.2. Funktion der Kininogene

Die Funktion der Kininogene als Kinin-Donor ist seit langem bekannt (Müller-Esterl, 1984). Dies ist auch die einzige Funktion, die bislang dem LMW-Kininogen zugeordnet werden kann. Seit 1976 ist die zentrale Rolle des HMW-Kininogens bei der Kontaktphasenaktivierung der endogenen Blutgerinnungskaskade bekannt (Griffin und Cochrane, 1976). Beim Rind ist dieser Mechanismus am besten untersucht. HMW-Kininogen zirkuliert gemeinsam mit Plasma-prokallikrein und/oder Faktor XI als Komplex im Plasma (Abb. 4a) (Thompson et al., 1979).

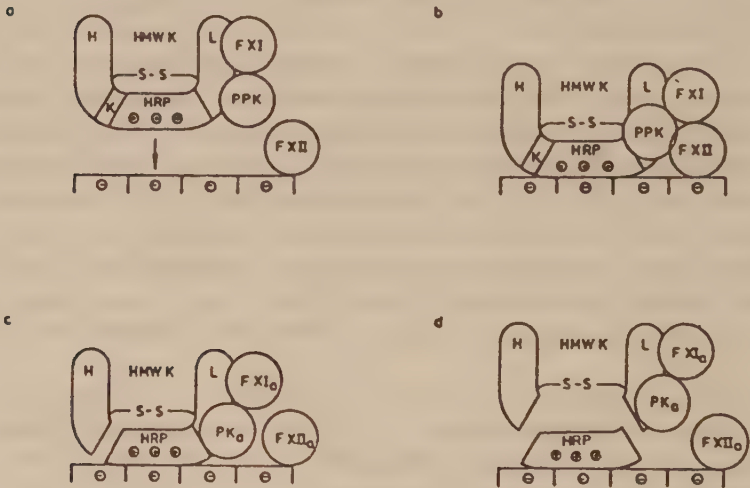


Abb. 4: Mechanismus der Kontaktphasenaktivierung beim Rind. HMWK, hochmolekulares Kininogen; H, schwere Kette; K, Kinin; HRP, Histidin-reiches Peptid; L, leichte Kette; PPK, Plasma-prokallikrein; FXI, Faktor XI; FXII, Faktor XII (Hageman Faktor); a, aktivierte Form eines Gerinnungsfaktors; $\ominus$, negativ geladene Oberfläche.

Bei einer Gefäßverletzung kommt es zur Freisetzung subendothelialer Oberflächen (Sugo et al., 1981; Nakahara, 1980), an deren angenommenen negativen Ladungen sich dieser Komplex über das sog. Histidin-reiche Peptid anlagert (Abb. 4b). Faktor XII wird in ähnlicher Weise an negativ geladene Oberflächen gebunden. Diese Faktoren werden dabei in eine solche Konfiguration zueinander gebracht, daß durch gegenseitige Aktivierung von Faktor XI, Faktor XII und Plasmaprokalikrein die endogene Blutgerinnungskaskade ausgelöst wird (Heimark et al., 1980). Dabei wird durch das aktivierte Plasmakallikrein Kinin (K) herausgespalten (Abb. 4c). Sekundär kommt es zur Abspaltung des Histidin-reichen Peptids (Han et al., 1975), wobei der Komplex von der Oberfläche abdissoziiert (Abb. 4d) und der Gerinnungsvorgang beendet wird (Sugo et al., 1980). Beim Menschen kommt es zu einer ähnlichen Aktivierung der Kontaktpase (Kerbiriou u. Griffin, 1979), es unterbleibt jedoch die sekundäre Abspaltung des Histidin-reichen Peptides, sodaß der Komplex an die Oberfläche gebunden bleibt. Die molekularen Grundlagen dieser Mechanismen sind noch unbekannt.

Das bisher nur bei der Ratte identifizierte T-Kininogen ist ein Akut-Phasen-Protein. Die Konzentration im Plasma steigt während eines Entzündungsprozesses auf ca. das Zwanzigfache an und macht damit etwa 10 % der Gesamtplasmaproteine aus (Urban et al., 1979; Esnard u. Gauthier, 1983). Die physiologische Bedeutung dieser erhöhten Expressionsrate ist jedoch bislang unklar.

Die einzigen Strukturabschnitte in den Kininogenen, denen eine der beschriebenen Wirkungen zugeordnet werden kann, sind das Kinin-Fragment und ein Teil der leichten Kette des hochmolekularen Kininogens (Histidin-reiches Fragment). Unbekannt sind jedoch die Funktionen der restlichen Bereiche der Kininogene, insbesondere die Funktion der schweren Ketten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die

Primärstruktur beider Kininogene aufzuklären und Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu finden, um funktionell wichtige Bereiche der Proteine zu erkennen. Ausserdem sollte in strukturellen Unterschieden von menschlichem und Rinderkininogen eine Erklärung für deren unterschiedliches Verhalten in der Gerinnung gefunden werden. Vergleiche mit anderen Proteinen, deren Primärstruktur bereits bekannt war, sollten eventuell Hinweise für weitere Funktionen der Kininogene liefern.

Material und Methoden

1. Chemikalien

Sämtliche Reagenzien waren von p.A. Qualität und wurden von MERCK/Darmstadt bezogen, mit Ausnahme von:

Thermolysin	BOEHRINGER, Mannheim
Chymotrypsin	"
Pyroglutamaminopeptidase	"
Carboxypeptidase Y	"

<i>Staphylococcus aureus</i> -Protease V8	MILES, Elkart/USA
Trypsin	MILLIPORE, Freehold/USA
Trifluoressigsäure	FLUKA, Buchs/Schweiz

Sequenatorchemikalien (Flüssigphase)

Benzol	FLUKA, Buchs/Schweiz
Ethylacetat	
Butylchlorid	
Quadrol	
PITC	
Heptafluorbuttersäure	

Sequenatorchemikalien (Gasphase)

Acetonitril	APPLIED BIOSYSTEMS
TFA	
PITC	
Trimethylamin	
Butylchlorid	
Ethylacetat	

DABITC

Fluka/Buchs

Micropolyamidfolien

SCHLEICHER & SCHÜLL,
Dassel

Trisacryl GF 05

LKB, Bromma/Schweden

Guanidinhydrochlorid

PIERCE, Rockford/USA

2. Isolierung humaner Kininogene

Die Reinigung von hochmolekularem und niedermolekularem Kininogen erfolgte gleichzeitig aus gesammeltem, humanem Plasma. Durch zwei Isolierungsschritte über Ionenaustauschersäulen mit DEAE- und CM-Sephadex konnte reines, hochmolekulares Kininogen mit einer Ausbeute von 34 % isoliert werden (Dittmann et al. 1981). Zur Nachreinigung des niedermolekularen Kininogens war ein zusätzlicher Reinigungsschritt über Immunaффinitätschromatographie an der immobilisierten γ -Globulin-Fraktion eines Immunserums gegen LMW Kininogen notwendig. Die Ausbeute des niedermolekularen Kininogens betrug 23 % (Müller-Esterl et al. 1982). Die Isolierung der Kininogene wurde im Labor von Dr. Müller-Esterl in der chirurgischen Klinik von den dortigen Mitarbeitern durchgeführt (Abb. 5).

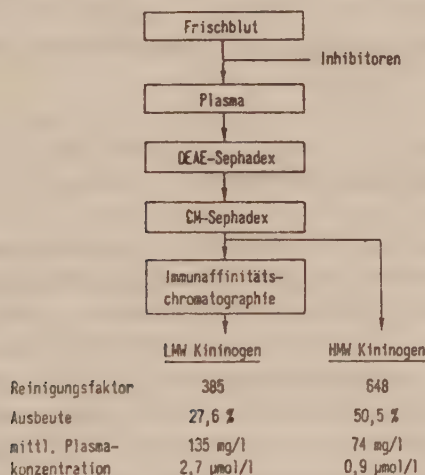


Abb.5: Protokoll zur Isolierung von Kininogenen aus humanem Plasma. Die Isolierung erfolgte unter Zugabe von Polybren (300 μ g/ml), Sojabohnentrypsininhibitor (75 μ g/ml), Trasylol (6 μ g/ml), EDTA (6 mM) und Benzamidin-HCl (1mM).

3. Proteinmodifikationen

3.1. Reduktion und Methylierung der Disulfidbrücken

Die Reduktion wurde in einer wäßrigen Lösung aus 6 M Guanidinhydrochlorid, 0.1 M Tris und 0.01 M EDTA durchgeführt. Der pH der Lösung wurde mit Essigsäure auf 8.5 eingestellt. Es wurden 100 nM des Proteins in 400 µl Puffer gelöst und 20 µl Mercaptoethanol hinzugefügt (Endkonzentration 5%). Das Reaktionsgemisch wurde mit Stickstoff gespült und 20 Std. bei 37°C inkubiert. Zur S-Methylierung wurden 20 µl Methyljodid zugegeben und 20 min geschüttelt. Nach Zugabe von weiteren 20 µl Mercaptoethanol wurde das Gemisch über Trisacryl GF 05 entsalzt.

Zur Carboxymethylierung wurde das reduzierte Protein mit einem 100-fach molaren Überschuß an Jodessigsäure über Cystein (*Crestfield et al., 1963*), gelöst in 50 µl 1 N NaOH, versetzt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Stickstoff inkubiert.

3.2. Oxidation von Disulfidbrücken

Die Aufspaltung von Disulfidbrücken tryptischer Peptide während der Bestimmung der Lage der Disulfidbrücken erfolgte durch Oxidation des Cystins zu Cysteinsäure (*Moore, 1963*). Dazu wurden 100 µl einer 30 %-igen Wasserstoffperoxidlösung mit 900 µl konz. Ameisensäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. 10 µg Protein wurden mit 50 µl Perameisensäure eine Stunde bei 0°C inkubiert und anschließend entsalzt und eingedampft. Die so entstandenen Peptide wurden mittels HPLC aufgetrennt.

3.3. Citraconylierung und Spaltung an den Arginylbindungen.

Um eine selektive Spaltung an den Arginylbindungen durch Trypsin zu erreichen, wurden die ϵ -Aminogruppen der Lysine durch Citraconylierung blockiert (*Dixon und Perham, 1968*). 100 nM Protein wurden in 3 ml Wasser/Triethylamin pH 8.0 gelöst. Dann wurden 100 μ l Citraconsäureanhydrid in 400 μ l Äther in kleinen Portionen zugegeben und der pH mit NaOH konstant gehalten (pH 8.0). Nach ca. 1 Std. wurden 100 μ g Trypsin zugegeben und bei 37°C für 4 Std. inkubiert. Zur Deblockierung der Aminogruppen wurde der pH mit Ameisensäure auf 2.5 eingestellt und die Lösung 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

4. Spaltungen von Peptidbindungen

4.1. Spaltung der Methionyl-Bindungen mit Bromcyan

Das carboxymethylierte Protein wurde in 0.5 ml 70 % Ameisensäure aufgenommen und 0.5 ml 20 % BrCN-Lösung in 70 % Ameisensäure zugegeben (*Gross und Wittkopp, 1961*). Das Gemisch wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen, anschliessend mit dem 10-fachen Volumen an Wasser verdünnt und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

4.2. Spaltung mit Hydroxylamin (*Bornstein et al., 1970; Henschen et al., 1976*)

Zur Spaltung der Asparaginyll-Glycyl Bindungen wurden 50 nmol carboxymethyliertes Protein in 1 ml einer Lösung von 6 M Hydroxylammoniumhydrochlorid, 4.8 M Guanidinhydrochlorid und 0.2 M Kaliumkarbonat, deren pH-Wert mit Natriumhydroxid auf 9 eingestellt worden war, 4 Stunden bei 45°C inkubiert. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch mit Ameisensäure auf

pH 2.5 eingestellt und über eine Säulenkombination aus zwei Gelfiltrationssäulen (TSK 2000 SW und Waters I-125) aufgetrennt.

4.3. Spaltung mit N-Chlorsuccinimid

Zur selektiven Spaltung der Tryptophanyl-Bindungen wurde das carboxymethylierte Protein mit N-Chlorsuccinimid oxidativ chloriniert (*Shechter et al.*, 1976, *Lischwe et al.*, 1977). 10 nmol Protein wurden in 200 µl 50 %iger Essigsäure gelöst. Anschließend wurden 400 µl einer N-Chlorsuccinimid-Lösung (10 mg N-Chlorsuccinimid in 1 ml 50 % Essigsäure) zugegeben und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dithioerythrit beendet und das Spaltgemisch über eine Gelfiltrationssäule TSK 3000 SW aufgetrennt.

4.4. Spaltung mit N-Bromsuccinimid

Zur Spaltung der Tryptophanyl- und Tyrosinyl-Bindungen wurden 10 nmol des Peptids in 200 µl 50% Essigsäure gelöst und 200 µl einer 0.5 M N-Bromsuccinimidlösung zugegeben (*Ramachandran et al.*, 1967). Die Absorption des Spaltgemisches wurde bei 260 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Lyophilisation abgestoppt, nachdem kein weiterer Anstieg der Absorption zu beobachten war.

4.5. Spaltung mit Gewebeskallikrein

Zur limitierten Proteolyse des humanen niedermolekularen Kininogens wurden 60 mg Protein mit 20 µg Gewebeskallikrein (molares Verhältnis Protein : Enzym = 1500 : 1) 30 min bei

37°C inkubiert. Die Proteolyse wurde durch Erhitzen auf 95°C für 10 min abgestoppt. Anschließend wurden die Spaltprodukte reduziert und carboxymethyliert (Müller-Esterl et al., 1985).

4.6. Spaltung mit Plasmakallikrein

Zur limitierten Proteolyse des hochmolekularen Kininogens mit Plasmakallikrein wurden 10 mg Kininogen mit 14 µg Plasmakallikrein (molares Verhältnis Substrat : Enzym = 220 : 1) 15 min in 0.1 M Tris, pH 8.0, inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Diisopropyl-fluorophosphat abgestoppt (Müller-Esterl et al., 1986). Anschließend wurden die Spaltprodukte reduziert und carboxymethyliert.

4.7. Spaltung mit Trypsin

Zur Spaltung der Arginyl- und Lysyl-Bindungen wurden 50 nmol Peptid in 300 µl 0.1 M Ammoniumhydrogenkarbonat, pH 8.0, gelöst (Schneider et al., 1983) und mit TPCK-behandeltem Trypsin (Gewichtsverhältnis Protein : Enzym = 50:1) versetzt. Das Spaltgemisch wurde 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit Ameisensäure abgestoppt.

Zur Vorfragmentierung des niedermolekularen Kininogens bei der Aufklärung der Lage der Disulfidbrücken wurden 5 nmol LMW Kininogen in 100 µl 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8.0, gelöst und mit 0.6 µg Trypsin (Gewichtsverhältnis Protein : Enzym = 500:1) (Salvesen et al., 1986) 8 Stunden bei 37°C gespalten. Die Reaktion wurde mit Ameisensäure abgestoppt und das Spaltgemisch über eine Gelfiltrations-säule TSK 3000 SW aufgetrennt.

4.8. Spaltung mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease

Zur Spaltung an den Asparaginy- und Glutaminyl-Bindungen (Houmard und Drapeau, 1972 und Drapeau, 1977) wurden 50 nmol Peptid in 300 µl 0.05 M Natriumphosphat, pH 7.8, gelöst und mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease (Gewichtsverhältnis Peptid : Protease = 30:1) 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ansäuern mit konz. Ameisensäure wurde das Gemisch über Reversed Phase HPLC getrennt.

Zur ausschließlichen Spaltung der Glutaminyl-Bindungen wurde das Peptid in 300 µl 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 7.8 gelöst und unter gleichen Bedingungen hydrolysiert.

4.9. Spaltung mit Thermolysin

Zur Spaltung mit Thermolysin (Heinriksen, 1977) wurden 100 nmol Peptid in 1.7 ml 0.1 M Ammoniumbicarbonat, pH 8.0, gelöst und mit Thermolysin (Gewichtsverhältnis Peptid : Protease = 50:1) 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit konz. Ameisensäure abgestoppt. Die Auftrennung des Spaltgemisches erfolgte über Reversed Phase HPLC.

4.10. Spaltung mit Pyroglutamat-aminopeptidase

Das Kininogen besitzt als N-terminale Aminosäure Pyroglutaminsäure. Da Pyroglutaminsäure keine freie Aminogruppe besitzt, ist es für den Edman-Abbau nicht zugänglich. Die Abspaltung dieser Aminosäure erfolgt enzymatisch durch Pyroglutamat-aminopeptidase (Podell und Abraham, 1978)

0.6 mg der carboxymethylierten schweren Kette des hochmolekularen Kininogens wurden in 1 ml Testpuffer (0.1 M Natrium-phosphatpuffer, pH 8.0, + 0.01 M EDTA + 5% Glycerin + 5 mM Dithiothreitol) gelöst und 0.1 mg Enzymlyophilisat (entspricht 0.005 mg reines Enzym) zugegeben. Das

Spaltgemisch wurde 1 Stunde bei 37°C unter Stickstoff inkubiert. Anschließend wurde der Spaltansatz über eine Trisacryl-Säule (20 cm x 2.2 cm), die in 0.1 M TFA äquilibriert wurde, entsalzt und direkt sequenziert.

4.11. Spaltung mit Carboxypeptidase Y

Zum Nachweis der C-terminalen Aminosäuren wurde das carboxyterminale Bromcyan-Peptid mit Carboxypeptidase Y (Hayashi et al. 1973, Hayashi, 1977, Henschen et al., 1979) verdaut. 50 nmol des Peptids wurden in 200 µl Puffer (0.1 M Essigsäure, pH mit Tris auf 5.5 eingestellt) gelöst. Der Puffer enthielt als internen Standard 10 nmol Norleucin pro 50 µl Puffer. Nach einer kurzen Vorinkubation bei 37°C wurden 100 µg Carboxypeptidase Y in 100 µl Puffer zugegeben. Nach 0, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten wurden je 50 µl entnommen, kurz im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend getrocknet. Zur Aminosäureanalyse wurden die Proben in Citratpuffer, pH 2.2, gelöst und auf einen Analysator der Firma BIOTRONIK aufgetragen.

5. Abspalten der O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten mit Flußsäure

Zur Abspaltung der O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten wurden 20 nmol des lyophilisierten Glykopeptids eine Stunde mit 1 ml mehrfach redestillierter Flußsäure (Mort et al., 1977) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde in Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Anschließend wurden die Proben im Exsikkator über Natriumhydroxid getrocknet und direkt auf den Sequenator aufgetragen.

6. Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden im Plattengelfverfahren nach Laemmli (1970) durchgeführt. Verwendet wurden lineare, diskontinuierliche Polyacrylamidgradientengele von 10-15% (w/v). Die angelegten Stromstärken waren 30 mA für 30 min. und anschließend 40 mA für 150 min. Als Markerproteine (je 5 µg) wurden verwendet: Phosphorylase b (94 kDa), Rinder-serumalbumin (68 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Sojabohnen-Trypsininhibitor (21 kDa) und Lysozym (14 kDa). Die Fixierung der Proteine erfolgte 1 Stunde in einer Lösung aus 10 % Trichloressigsäure in 10 % Essigsäure und 30 % Methanol. Die Proteine wurden in 0.5 % Coomassie Brilliant Blue in 10 % Essigsäure und 40 % Methanol angefärbt und in 10 % Essigsäure und 25 % Methanol über Nacht im Schüttelbad entfärbt.

7. Chromatographiemethoden

7.1. Entsalzungen

Die Abtrennung niedermolekularer Bestandteile von Proteinen und Peptiden erfolgte über eine Gelfiltrations-säule Trisacryl GF 05 (20 cm x 2.2 cm). Die Säule war mit 0.1 % Trifluoressigsäure äquilibriert. Die Durchfluß-geschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die Detektion des Eluats erfolgte im Durchflußphotometer bei 206 nm.

7.2. Gelfiltration

Die Auftrennung von Peptiden und Proteinen nach deren Molekulargewicht erfolgte durch HPLC-Gelfiltrationssäulen. Verwendet wurden die Säulen TSK 2000 SW, TSK 3000 SW und TSK 4000 SW (60 cm x 0.75 cm) der Firma LKB und eine I-125 Gelfiltrationssäule der Firma Waters. Die Säulen waren mit

0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) äquiliibriert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0.5 ml/min. Das Eluat wurde im Durchflußphotometer bei 206 nm gemessen.

7.3. Reversed Phase Hochdruck Flüssigkeits Chromatographie

Reversed Phase HPLC wurde auf einer HPLC-Anlage der Firma LKB durchgeführt, bestehend aus zwei Pumpen (LKB 2150), einem Rheodyne Injektor (2175) mit einer 2 ml Auftragschleife, einem Festwellenlängendetektor (LKB 2158) mit einem 206 nm Filter und einem Zweikanalschreiber (LKB 2210). Zur Identifizierung tryptophanhaltiger Peptide wurde ein Detektor mit variabler Wellenlänge (LKB 2151) zur Messung bei 280 nm in Serie geschaltet.

Reversed Phase HPLC wurde auf Hibar LiChrospher RP 10-Säulen (0.46 cm x 25 cm oder 0.46 cm x 12.5 cm), beziehungsweise für größere Peptide auf Vydak TP RP 10 Säulen (0.46 cm x 25 cm oder 0.46 cm x 12.5 cm), durchgeführt. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten, bestehend aus Lösungsmittel A (0.1 % TFA in Wasser) und Lösungsmittel B (0.1 % TFA in Acetonitril). Rechromatographien wurden in einem linearen Gradientensystem aus 0.05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 3.5, (Lösungsmittel A) und reinem Acetonitril (Lösungsmittel B) durchgeführt.

7.4. Ionenaustausch-Chromatographie

Die Trennung von leichter und schwerer Kette des HMW Kininogens erfolgte auf einer Ionenaustauschersäule SP-Sephadex. Als Puffersystem wurde 0,1 M Natriumacetat, pH 5.8, verwendet. Eluiert wurde mit einem NaCl-Gradienten von 0-0.5 molar in 40 min. Die Flußrate war 0.2 ml/min.

8. Aminosäureanalysen

Die Peptide wurden unter Vakuum mit 5.7 N HCl bei 110°C 24 Stunden oder bei 140°C 4 Stunden hydrolysiert. Die Proben wurden anschließend eingedampft und in Citrat-Puffer, pH 2.2, gelöst. Die Analysen wurden auf einem Aminosäure-analysator der Firma BIOTRONIK durchgeführt.

Für empfindlichere Analysen kam die "pre-column" Derivatisierungsmethode mit o-Phthaldialdehyd zur Anwendung. Die Hydrolysen wurden in der Gasphase (6 N HCl/10 % TFA) bei 160°C über 20 Minuten durchgeführt (*Tsugita et al.*, 1987). Die Auftrennung der OPA-Derivate erfolgte durch HPLC über eine Reversed Phase-Säule der Firma Bischoff (Spherisorb ODSII 3 µm)

9. Bestimmung von Disulfidhaltigen Fraktionen der HPLC

Ein Aliquot jeder Chromatographiefraktion wurde in ein Reagenzglas pipettiert und mit Stickstoff getrocknet. Zur Reduktion der Disulfidgruppen wurde 0.1 ml einer frisch zubereiteten Borhydridlösung zugegeben und eine Stunde bei 50°C inkubiert (*Henschen*, 1978). Überschüssiges Borhydrid wurde durch Zugabe von 0.05 ml 1 N HCl zerstört. Nach 30 min wurde 1 ml Ellmann's Reagenz (*Ellmann*, 1959) (0.13 % 5'5'Dithiobis-2-nitrobenzol) in 0.04 M Natriumhydrogenphosphat, pH mit Natronlauge auf 8.1 eingestellt) zugegeben und die Absorption bei 410 nm gemessen.

10. Sequenzanalysen

10.1. Manuelle N-terminale Aminosäuresequenzanalyse

Die manuelle N-terminale Aminosäuresequenzanalyse wurde nach der Diaminoazobenzolisothiocyanat-Methode (*Chang et*

al., 1978) durchgeführt. Die Identifizierung der Diamino-azobenzolthiohydantoin-Derivate erfolgte dünnschicht-chromatographisch auf Micropolyamid-Folien (Schleicher & Schüll, Dassel).

10.2. Automatische N-terminale Sequenzanalyse

Für automatische Sequenzanalysen kamen zwei Typen von Sequenatoren zur Anwendung.

A.) Flüssigphasensequenator

Im Flüssigphasensequenator kam die Sequenatorversion (Edman und Begg, 1967) des Edman-Abbaus (Edman, 1975) zur Anwendung. Als Sequenator wurde ein Prototyp verwendet, dessen Programm für das Sequenzieren von Peptiden optimiert wurde. Der Abbau wurde in 0.1 M Quadrol in Gegenwart von Polybren (Capra et al., 1977) durchgeführt. Die Konvertierung der Thiazolinone zu den Phenylthiohydantoinen wurde in einem modifizierten Autoconverter P 6 von Sequamat durchgeführt (Henschen-Edman et al.; 1980). Die Reinigung der Lösungsmittel erfolgte nach Edman und Henschen (1975). Die Identifizierung der Phenylthiohydantoinderivate erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie in einem ternären Lösungsmittelsystem, das alle Komponenten (Abb. 6) isokratisch zu trennen vermag (Lottspeich; 1980 und 1985).

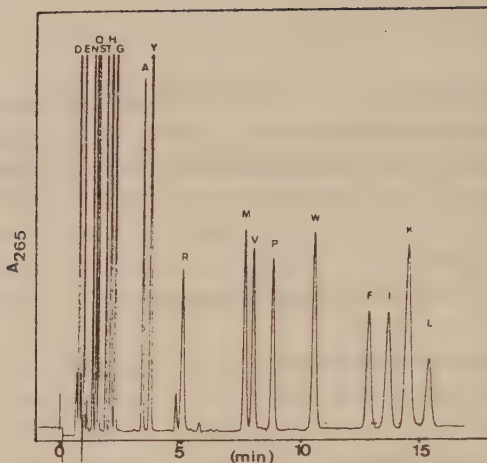


Abb. 6: Isokratische Trennung der PTH-Aminosäuren auf einer Reversed Phase-Säule Hibar LiChrosorb RP-18 (25 cm x 0.46 cm). Durchfluß: 1.5 ml; Lösungsmittelsystem: 68.5% 0.01 M Natriumacetat, pH 5.2, 31.5% Acetonitril, 0.5% Dichlorethan. Säulentemperatur: 62°C. Injiziert wurden 100 pmol/Aminosäure.

Zum Abblockieren freier Aminotermini außer Prolin wurden die Peptide CB 3 und CB 4 der leichten Kette des hochmolekularen Kininogens mit o-Phthaldialdehyd (Brauer et al.; 1984) blockiert.

Dazu wurden anstelle des Phenylisothiocyanates der Kopplungs-Reaktion 200 µl einer Lösung aus 1 mg o-Phthaldialdehyd und 5 % Mercaptoethanol direkt in die Reaktionskammer ("Spinning Cup") des Sequenators gegeben. Die Reaktionszeit betrug 5 min. Nach anschließenden, verlängerten Waschschritten mit Benzol und Ethylacetat und einem Vakuumschritt wurde der normale Edman-Abbau gestartet.

Da die Abspaltung von Prolin langsamer abläuft, wurde die Spaltzeit in Schritten mit Prolin verlängert (Brandt et al., 1976)

B.) Gasphasensequenzator

Ein Teil der Peptide wurde in einem kommerziell erhältlichen Sequenzator 470A der Firma *Applied Biosystems* sequenziert (*Huncapillar et al., 1982*). Die Konvertierungsreaktion wurde in einem im Sequenzator eingebauten Autokonverter bei 50°C durchgeführt.

11. Computerprogramme

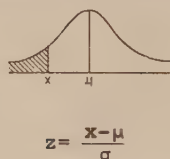
11.1 "Search" (*Orcut et al., 1982*)

Das Computerprogramm "Search" wird zum Auffinden homologer Proteine oder homologer Sequenzabschnitte verwendet. Es vergleicht Peptide einer bestimmten Länge (25 Aminosäuren) mit allen Abschnitten gleicher Länge jeder in der Datenbank gespeicherten Sequenz. Der Datenbank liegt der "Atlas of Protein Sequence and Structure" (*Dayhoff et al., 1978*) zu Grunde. Zum Feststellen entfernter Verwandtschaften bei Aminosäureaustauschen wurde die "Mutation Data Matrix" (*Dayhoff et al., 1978*) verwendet.

11.2. "Relate" (*George et al., 1982*)

Das Programm "Relate" vergleicht alle möglichen Segmente einer bestimmten Länge (25 Aminosäuren) einer Sequenz mit allen möglichen Abschnitten gleicher Länge einer zweiten Sequenz. Jedem Aminosäurepaar wird ein Wert der "Dayhoff Mutation Data Matrix" zugeordnet. Die ermittelten Werte werden mit den Werten verglichen, die auf gleiche Weise aus Zufallssequenzen ermittelt wurden. Die Zufallssequenzen werden aus der Aminosäurezusammensetzung der beiden Proteine gebildet. Dieser Vorgang wird 100 mal wiederholt.

Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei Sequenzen homolog sind, wird in SD-Einheiten ausgedrückt und ermittelt sich aus der Differenz der ermittelten Werte für die reale Sequenz (x) und den Durchschnittswerten für die Zufallssequenz (μ), dividiert durch die Standardabweichung (σ) der Werte der Zufallssequenz (Abb. 7).



z	Wahrscheinlichkeit
1.0	0.159
2.0	0.227×10^{-1}
3.0	0.135×10^{-2}
4.0	0.317×10^{-4}
5.0	0.287×10^{-6}
6.0	0.987×10^{-9}
7.0	0.128×10^{-11}

Abb. 7: Normalverteilung mit dem Mittelwert μ und der Standardabweichung σ . Die Wahrscheinlichkeit eines Werts $>x$ ist beschrieben als $z=(x-\mu)/\sigma$.

11.3. Theoretische Vorhersage der Sekundärstruktur

Die Vorhersage der Sekundärstruktur des Kininogens wurde nach der Methode von *Chou und Fasman* (1978) durchgeführt. Überlappende Bereiche von α -Helix und β -Faltblattstrukturen wurden nach der Wahrscheinlichkeitsvorhersage nach *Nishikawa* (1983) aufgelöst. Das heißt, Bereiche, die sowohl α -Helix als auch Faltblattstruktur einnehmen können, wurden mit Röntgenstrukturanalysen bekannter Proteine verglichen und entsprechend korrigiert. Als Bedingung für Faltblattstrukturen wurde eine Minimallänge von 5 Aminosäuren in dieser Strukturvariante verlangt. Das Computerprogramm wurde insofern verändert, als aufeinanderfolgende β -turns zu einem einzigen zusammengefaßt wurden. Derartige repräsentative turns wurden durch die Strukturvorhersage nach *Robson* (1970) überprüft. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Hydrophilizitätsprofil in einem gesonderten Diagramm dargestellt.

11.4. Berechnung der Hydrophilizität

Hydrophile bzw. hydrophobe Bereiche wurden nach der Computermethode von *Levitt* (1976) berechnet. Das Programm wurde von *Hopp und Woods* (1981) modifiziert. Die Parameter beruhen auf Analysen eines Modellproteins (bovine pancreatic trypsin inhibitor).

Ergebnisse

1. Strukturaufklärung des hochmolekularen Kininogens

HMW Kininogen besitzt ein Molekulargewicht von 114 kD in der SDS Gelelektrophorese. Zur Vorfraktionierung dieses großen Proteins wurde das physiologische Spaltverhalten des Kininogens gegenüber Kallikreinen benutzt, um geeignete Peptide zur weiteren Strukturaufklärung zu erhalten. Dazu wurde HMW Kininogen mit Plasmakallikrein gespalten und die entstandenen Fragmente nach Alkylierung der Halbcystine über Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Die Trennung der Fragmente wurde freundlicherweise von Herrn Günther Rauth durchgeführt.

Ein Aliquot jeder Fraktion wurde für eine Molekulargewichtsbestimmung im SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 8) verwendet. HMW Kininogen wird durch Plasmakallikrein in eine schwere Kette (63 kD), eine leichte Kette (58 kD) und das Kininfragment (1 kD) gespalten. Als zusätzliches Kriterium für die Reinheit der isolierten Peptide diente eine N-terminale Ansequenzierung der Fragmente.

Fraktion A: keine N-terminale Aminosäure

Fraktion B: S-S-R-I-G-E-

Da bei Fraktion A keine Aminosäure abgespalten werden konnte, wurde angenommen, daß die N-terminale Aminosäure posttranslational modifiziert und dadurch für den Edman-Abbau nicht mehr zugänglich war. Die schwere Kette und die leichte Kette dienten als Ausgangsmaterial zur weiteren Strukturaufklärung des hochmolekularen Kininogens. Eine Aminosäureanalyse (Tab. 1) des Gesamtproteins und der einzelnen Ketten zeigte, daß beide Ketten mehrere Kohlenhydratseitenketten besitzen mussten. Somit war eine Berechnung des Molekulargewichtes und damit eine Berechnung der genauen Aminosäurezusammensetzung nicht möglich. Die

Werte aus Tabelle 1 sind deshalb verbesserte Werte, bezogen auf das errechnete Molekulargewicht nach Vervollständigung der Aminosäuresequenz.

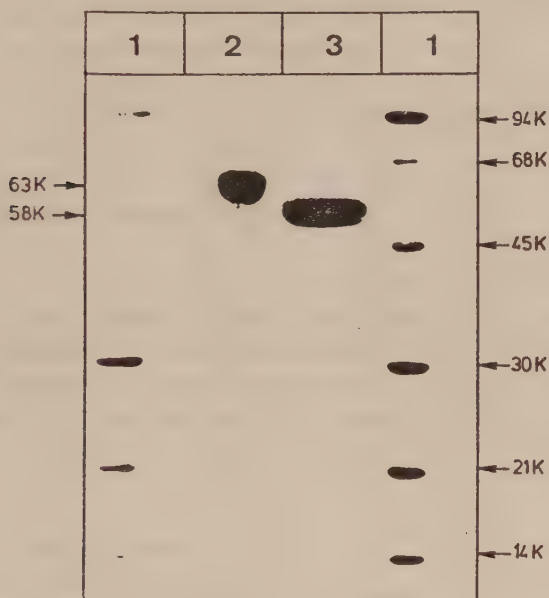


Abb. 8: Lineare 10-15% SDS PAGE der isolierten Fraktionen. Markerproteine (1); schwere Kette entsprechend Fraktion A (2); leichte Kette entsprechend Fraktion B (3).

Tab.1: Aminosäureanalyse des HMW Kininogens (HMWK) und der Spaltprodukte nach Spaltung mit Plasmakallikrein. In Klammern die Anzahl der Aminosäuren aus der Sequenzanalyse. Tryptophan wurde nicht bestimmt (n.d.). GluNac und GalNac wurden nicht quantitativ bestimmt.

Aminosäure	HMWK	schwere Kette	leichte Kette	Kinin
Cys(Cm)	12.1 (18)	11.3 (17)	0.4 (1)	
Asx Asn	70.4 (30)	42.6 (23)	27.9 (7)	
Asp	(41)	(20)	(21)	
Ser	41.2 (48)	20.9 (25)	17.3 (22)	1.3 (1)
Thr	46.4 (51)	26.8 (32)	16.2 (19)	
Glx Glu	78.2 (41)	46.5 (25)	31.6 (16)	
Gln*	(36)	(22)	(14)	
Pro	34.7 (39)	14.4 (16)	18.3 (20)	2.3 (3)
Gly	45.6 (46)	16.5 (16)	29.5 (29)	1.4 (1)
Ala	29.4 (29)	22.3 (22)	7.4 (7)	
Val	28.5 (29)	23.5 (24)	4.7 (5)	
Met	6.2 (7)	2.4 (3)	3.6 (4)	
Ile	29.7 (30)	19.6 (20)	9.7 (10)	
Leu	33.3 (33)	21.7 (21)	11.9 (12)	
Tyr	15.5 (16)	13.6 (14)	1.6 (2)	
Phe	23.6 (24)	15.5 (16)	5.6 (6)	1.5 (2)
Lys	50.4 (50)	29.4 (29)	21.4 (21)	
His	30.2 (31)	3.8 (4)	26.8 (27)	
Arg	19.9 (20)	9.9 (10)	7.5 (8)	1.9 (2)
Trp	n.d. (7)	n.d. (3)	n.d. (4)	
Total	626	362	255	9
GluNac	+	+	-	-
GalNac	+	-	+	-

1.1. Strukturaufklärung der schweren Kette des hochmolekularen Kininogens

Die schwere Kette des HMW Kininogens war am N-Terminus für den Edman-Abbau nicht zugänglich. Da Proteine häufig N-terminal mit Pyroglutaminsäure (5-Oxoprolin) blockiert sind, wurde zunächst versucht, die N-terminale Aminosäure enzymatisch abzuspalten. Dazu wurden 0.6 mg der schweren

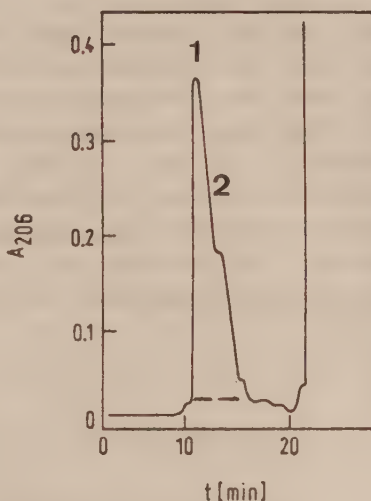
Kette mit 0.1 mg Pyroglutamat-Aminopeptidase eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend über eine TRISACRYL-Säule entsalzt. Das Protein wurde direkt im Gasphasensequenzator ansequenziert, wobei 44 Aminosäuren identifiziert werden konnten. Da die Deblockierung erfolgreich war, mußte die N-terminale Aminosäure Pyroglutaminsäure (Z) sein.

Z-E-S-Q-S-E-E-I-D-C-N-D-K-D-L-F-K-A-V-D-A-A-L-K-K-Y-N-S-
Q-N-Q-S-N-N-Q-F-V-L-Y-R-I-T-E-A-T-

1.1.1. Spaltung der schweren Kette mit Bromcyan

Zur weiteren Strukturaufklärung wurde anhand der Aminosäureanalyse nach einer geeigneten Spaltmethode gesucht, um zunächst wenige große Fragmente zu erhalten. Da nur 3-4 Methioninreste in der schweren Kette zu erwarten waren, schien eine Spaltung mit Bromcyan am geeignetsten zu sein.

Abb. 9: Gelpermeationschromatographie des Bromcyanspaltgemisches der schweren Kette. Säule: TSK 2000 SW äquilibriert mit 0.1 % TFA. Durchflußrate 0.5 ml/min.



Dazu wurden 50 nmol Protein in 500 µl 70 % Ameisensäure mit 10 % Bromcyan gespalten und das Spaltgemisch über Gelchromatographie aufgetrennt (Abb. 9). Trotz der schlechten Trennung der Gelpermeationschromatographie konnte eine homogene Sequenz von 21 Aminosäuren identifiziert werden.

CB 2 L-N-E-V-K-R-A-Q-R-Q-V-V-A-G-L-N-F-R-I-T-Y-

Die Heterogenität der Peaks ist auf eine unvollständige Spaltung am Methionylrest zurückzuführen. Die Spaltausbeuten lagen bei ca. 10 %. Da jedoch das Gesamtprotein ebenso wie das N-terminale Fragment durch Pyroglutaminsäure blockiert ist, war nur eine Sequenz für den Edman-Abbau zugänglich. Die niedrigen Spaltausbeuten ließen jedoch eine Vorfragmentierung durch eine Bromcyan-Spaltung nicht mehr in Betracht kommen.

1.1.2. Spaltung der schweren Kette mit Trypsin nach Blockierung der Lysinreste

Eine weitere Möglichkeit, relativ große Fragmente zu erhalten, bot sich durch eine Spaltung an den Arginylresten, da nach der Aminosäureanalyse nur 10 Argininreste zu erwarten waren. Dazu wurden 100 nmol Protein in Wasser/Triethylamin, pH 8.0, gelöst, und die Lysinreste mit Citraconsäureanhydrid blockiert. Anschliessend wurde die schwere Kette mit 100 µg Trypsin an den Arginylresten gespalten. Das Spaltgemisch wurde durch Reversed Phase-Chromatographie aufgetrennt (Abb. 10).

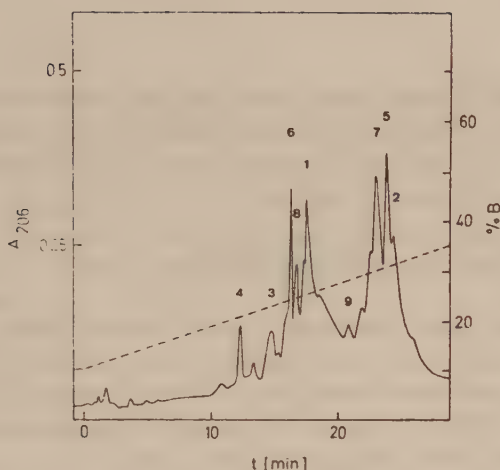


Abb. 10: HPLC der tryptischen Spaltung (nach Blockierung der Lysinreste) der schweren Kette. Die Trennung erfolgte auf einer Reversed Phase-Säule Vydac TP RP 18 (0.46 x 25 cm); Eluiert wurde mit einem linearen Gradientensystem von 0-60 % B in (A+B) in 60 min. Puffer A: 0.1 % TFA in Wasser; B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchflußrate: 1.5 ml/min.

Die einzelnen Peptide wurden im gleichen System nochmals rechromatographiert. Die N-terminale Sequenzanalyse der isolierten Peptide ergab folgende Ergebnisse:

- CT 1 I-T-E-A-T-K-T-V-G-S-D-T-F-Y-S-F-K-Y-E-I-K-E-G-D-X-P-V-Q-
- CT 2 S-S-T-K-F-S-V-
- CT 3 H-G-I-Q-Y-F-N-X-N-T-Q-H-S-S-L-F-M-L-N-E-V-K-R
- CT 4 Q-V-V-A-G-L-N-F-R
- CT 5 I-T-Y-S-I-V-Q-T-X-C-S-K-E-N-F-L-F-L-T-P-D-C-K-S-L-X-N-
- CT 6 I-A-S-F-S-Q-N-C-D-I-Y-P-G-K-D-F-V-Q-P-P-T-K-I-C-V-G-C-P-R
- CT 7 D-I-P-T-N-S-P-E-L-E-E-T-L-T-H-T-I-T-K-L-N-A-E-
- CT 8 Y-F-I-D-V-A-R
- CT 9 E-T-T-C-S-K-E-S-N-E-E-L-T-E-S-C-E-T-K-K-L-G-Q-S-L-D-C-N-A-E-V-Y-

Fragment CT 1 überlappt dabei mit dem N-terminalen Peptid von Position 41 bis 45. In Peptid CT 1 konnte Position 25, in Peptid CT 3 Position 8 und in Peptid CT 5 Position 9 und 26 nicht identifiziert werden.

1.1.3. Spaltung der schweren Kette mit Trypsin

Um Positionen, die noch nicht identifiziert werden konnten, nochmals sequenzieren zu können, bzw. um weitere, noch fehlende Sequenzinformation zu erhalten, wurden 50 nmol der schweren Kette mit Trypsin gespalten. Das Spaltgemisch wurde über Reversed Phase HPLC aufgetrennt (Abb. 11).

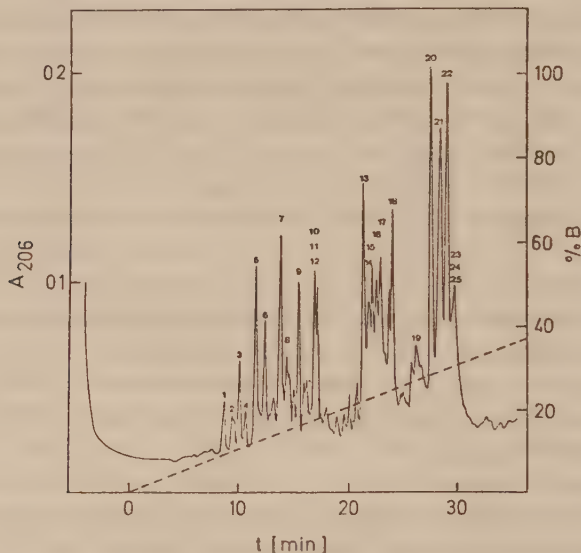


Abb. 11: HPLC der tryptischen Spaltung der schweren Kette des HMW Kininogens. Die Trennung erfolgte auf einer Reversed Phase-Säule Vydac TP RP 18 (0.46 x 25 cm). Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0-60 % B in (A+B) in 60 min. Puffer A: 0.1 % TFA in Wasser; Puffer B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchflußrate: 1.5 ml/min.

1/5 jeder Fraktion wurde manuell nach der Methode von Chang ansequenziert. Fraktionen, die nur eine N-terminale Hauptsequenz enthielten wurden anschließend im Gasphasensequenziator sequenziert. Fraktion 10/11/12 und Fraktion 23/24/25 enthielt je drei Sequenzen und mußte über Reversed Phase HPLC in einem anderen Puffersystem rechromatographiert werden (Abb. 12).

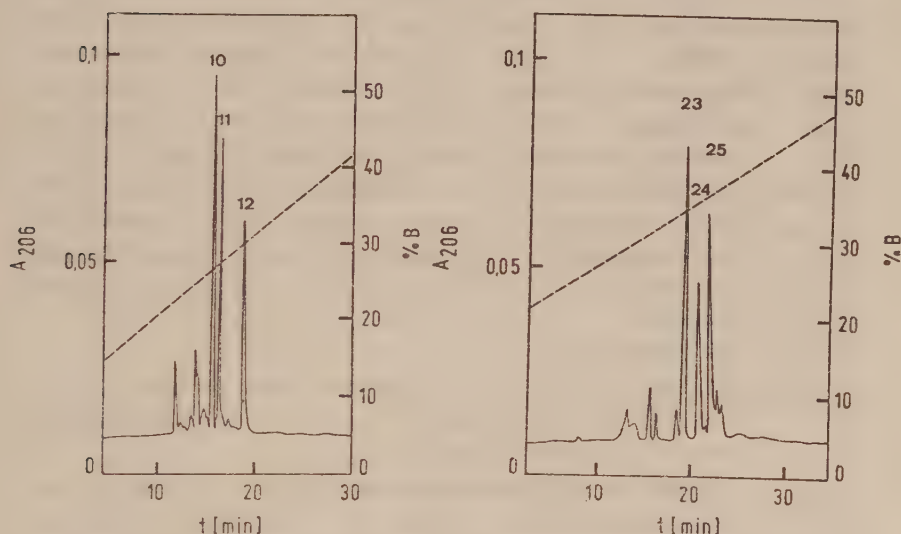


Abb. 12: Rechromatographie der Fraktionen 10/11/12 (I) und 23/24/25 (II). Die Trennung erfolgte auf einer Reversed Phase HPLC-Säule Vydac TP RP 18 (0.46 x 25 cm). Eluiert wurde in einem linearen Gradienten von 0-60 % B in (A+B) in 60 min. Puffer A: 0.05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 4; Puffer B: Acetonitril. Durchflußrate: 1.5 ml/min.

Die getrennten Peptide wurden anschließend nochmals im

TFA System rechromatographiert, um Salze zu entfernen, die sich auf den Edman-Abbau störend auswirken. 1/20 jedes Peptids wurde zur Aminosäureanalyse verwendet. Dabei konnten auch die Peptide identifiziert werden, die eine Kohlenhydratbindungsstelle enthielten. Insgesamt konnten 25 tryptische Peptide isoliert und sequenziert werden. Sie wurden alle, sofern die Sequenz nicht schon durch die unter 1.1.2. beschriebene Spaltung identifiziert werden konnte, soweit wie möglich durchsequenziert.

T 1	I-T-E-A-T-K
T 2	I-D-N-
T 3	E-G-D-C-P-V-Q-S-
T 4	D-A-A-
T 5	V-Q-V-
T 6	V-Q-V-V-A-G-K-K
T 7	Y-E-I-
T 8	A-V-D-A-A-L-K
T 9	I-C-V-G-
T 10	K-I-Y-P-
T 11	T-W-Q-D-C-E-Y-K
T 12	D-F-V-Q-
T 13	L-N-A-E-N-X-A-T-F-Y-F-K
T 14	A-A-T-G-E-C-T-A-T-V-G-K-R
T 15	L-G-Q-S-L-D-C-N-A-E-V-Y-V-V-P-W-E-K
T 16	I-A-S-F-
T 17	Y-N-S-Q-N-Q-S-N-N-Q-F-
T 18	T-V-G-S-
T 19	H-G-I-Q-Y-F-N-X-N-T-
T 20	D-I-P-T-N-
T 21	Y-F-I-D-F-
T 22	E-N-F-L-F-L-T-P-
T 23	S-L-W-N-G-D-T-G-E-C-T-D-N-A-Y-I-D-I-Q-L-
T 24	F-S-V-A-T-Q-T-C-Q-I-T-P-A-E-G-P-V-V-T-A-Q-Y-D-C L-G-C-V-
T 25	I-T-Y-S-I-V-Q-T-X-C-S-

In Position 6 des Peptids T 13, Position 8 des Peptids T 19 und in Position 9 des Peptids T 25 konnte keine Aminosäure identifiziert werden. Da diese Peptide in der Aminosäureanalyse Glucosamin aufwiesen, wurde davon ausgegangen, daß diese nicht identifizierbaren Aminosäuren die Bindungsstellen für die Kohlenhydratseitenketten darstellen. Aminosäuren mit Zuckerresten werden während des Edman-Abbaus zwar abgespalten, sie können jedoch nur sehr schlecht aus dem Reaktionskompartiment extrahiert werden. Zur Identifizierung der Kohlenhydratbindungsstellen wurden die Peptide T 13, T 19 und T 25 bis einschließlich der entsprechenden Leerstelle manuell N-terminal abgebaut, jedoch nicht extrahiert. Das Gemisch aus freien Aminosäuren und Restpeptid wurde über Reversed Phase HPLC aufgetrennt. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde hydrolysiert und zur Aminosäureanalyse verwendet. Eine der Fraktionen mußte Glucosamin und Asparaginsäure enthalten, da durch Desamidierung des Kohlenhydrat bindenden Asparagins Asparaginsäure entsteht.

1.1.4. Spaltung der schweren Kette mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease

Zur Isolierung von Überlappungspeptiden schien eine selektive Spaltung an den Glutaminsäureresten am geeignetsten zu sein. Für die Spaltung mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease wurden 2 mg der schweren Kette eingesetzt. Das so gewonnene Spaltgemisch wurde über HPLC aufgetrennt (Abb. 13).

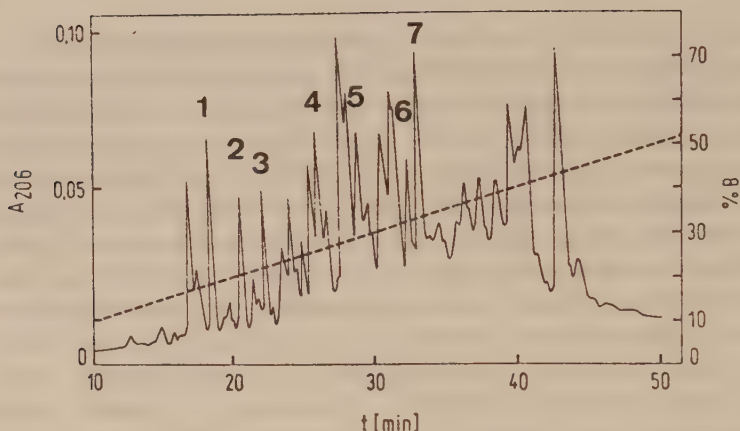


Abb. 13: HPLC der Spaltung der schweren Kette mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease. Die Trennung erfolgte auf einer Reversed Phase-Säule Vydac TP RP 18 (0.46 x 25 cm). Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0-60 % B in (A+B) in 60 min. Puffer A: 0.1 % TFA in Wasser; Puffer B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchflußrate: 1.5 ml/min.

Es wurden 7 Peptide isoliert und ansequenziert.

E 1	Y-K-D-A-A-K-A-A-T-G-E
E 2	V-Y-V-V-P-W-E
E 3	C-T-A-T-V-G-K-R-S-S-T-K-F-
E 4	G-D-C-P-V-Q-S-G-K-T-W-Q-
E 5	L-E-P-I-L-R-H-G-I-Q-Y-
E 6	T-K-K-L-G-Q-S-L-D-C-N-A-E
E 7	K-K-I-Y-P-T-V-N-C-Q-P-L-G-M-I-S-L-M-K

Peptid E 1 überlappte die drei tryptischen Peptide T 11, T 4 und T 14 in den Positionen 79/80 und 88/89. Durch Peptid E 3 konnte eine Überlappung in Position 96/97 erreicht werden. Peptid E 4 erstreckt sich von Position 64 bis 88 und schliesst eine Lücke zwischen Position 69 und 72. E 7 bildet

das C-terminale Fragment und überlappt somit in Position 361 und 362 mit Met-Lys-Bradykinin. Die Peptide E 2 und E 6 brachten keine neue Information.

Peptid E 7 bildet einen schwachen Overlap über die tryptischen Peptide T 10 und T 15. Dieses Peptid endet mit einem Lysinrest, da es den C-Terminus der schweren Kette darstellt. Da eine Position weiter N-terminal ein Tryptophan lokalisiert war, wurde versucht, durch eine Spaltung der Tryptophanyl-Bindung durch N-Chlorsuccinimid ein Peptid zu isolieren, das diesen Overlap bestätigt.

1.1.5. Spaltung der schweren Kette mit N-Chlorsuccinimid

Zur Spaltung der Tryptophanyl-Bindung wurden 10 nmol des Gesamtproteins eingesetzt. Das Spaltgemisch wurde durch Reversed Phase-Chromatographie aufgetrennt (Abb. 14).

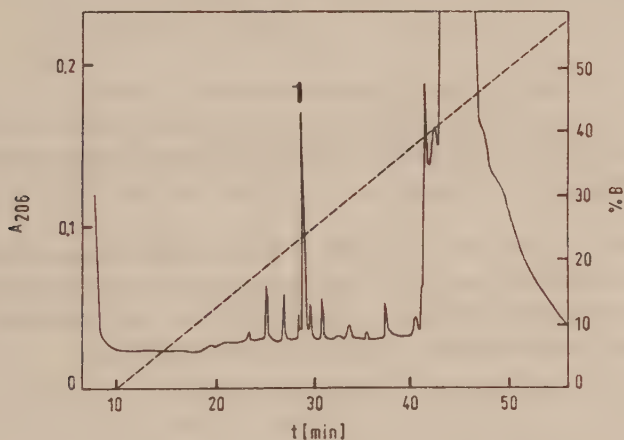


Abb. 14: Reversed Phase-Chromatographie des N-Chlorsuccinimid-Spaltgemisches. Säule: Hibar LiChrospher (12.5 cm x 0.46 cm); Lösungsmittel A: 0.1 % TFA in Wasser; B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchfluß: 1.5 ml/min.

Da nur sehr wenige Tryptophanreste in der schweren Kette vorhanden waren, konnte das relativ kleine C-terminale Peptid rein isoliert werden. Die grösseren Peptide und das ungespaltene Protein wurden in einem Peak mit ca. 40 % Acetonitril eluiert. Das gesuchte kleine Fragment wurde vier Schritte ansequenziert und überlappte wie erhofft mit den Peptiden E 2 und E 7 bzw. mit den Peptiden T 10 und T 15.

NCS 1 E-K-K-I-

Es fehlten zu diesem Zeitpunkt noch 4 Überlappungspeptide, die die nahezu vollständig identifizierten tryptischen Bruchstücke CT 5 mit CT 6, CT 6 mit CT 7, CT 7 mit CT 8 und CT 8 mit CT 9 verbinden. Da all diese Peptide in der Nähe des C-terminalen Endes einen Glutaminsäure- oder einen Asparaginsäurerest enthielten, erschien es am sinnvollsten, eine Spaltung an den Glutaminyl- und Asparaginyln-Bindungen durchzuführen.

1.1.6. Spaltung der schweren Kette mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease

Dazu wurden 2 mg der schweren Kette mit *Staphylococcus Aureus* V8-Protease gespalten und durch Reversed Phase-Chromatographie aufgetrennt (Abb. 15). Von den gesammelten Fraktionen wurden Aminosäureanalysen durchgeführt.

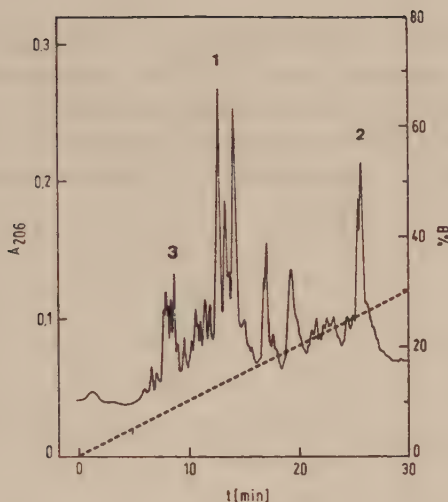


Abb. 15: Reversed Phase-HPLC nach der *Staphylococcus aureus* V8-Protease Spaltung. Säule: Hibar LiChrospher (12.5 cm x 0.46 cm); A, 0.1 % TFA, B, 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchfluß: 1.5 ml/min.

Die fehlenden Überlappungspeptide mußten jeweils mindestens einen Argininrest enthalten, da Peptide aus einer Arginin-Spaltung verbunden werden sollten. Es konnten drei argininhaltige Peptide gereinigt und ansequenziert werden.

D 1 I-Q-L-R-I-A-S-F-S-

D 2 N-V-K-K-A-R-V-Q-V-V-A-G-K-K-Y-F-I-

D 3 F-V-A-R-E

Fragment D 1 verbindet die beiden Bruchstücke CT 5 und CT 6. Fragment D 2 reicht von CT 6 über ein tryptisches Fragment T 6 bis zu CT 7. Das Peptid D 3 bildet einen sehr schwachen Overlap von einer Aminosäure von CT 8 und CT 9. Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit die Nucleotidsequenz der cDNA der humanen Kininogene veröffentlicht wurde (Takagaki et al., 1986), wurde das letzte, noch fehlende Überlappungspeptid zwischen Position 261 und 262 nicht mehr isoliert.

Aus den isolierten proteolytischen Fragmenten konnte die vollständige Sequenz (Abb. 16) der schweren Kette des hochmolekularen Kininogens abgeleitet werden. Die schwere Kette ist aus 362 Aminosäuren aufgebaut und enthält 3 N-glycosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten (Kellermann et al., 1986).

Abb. 16: (Zu Abbildung von Seite 41). Aminosäuresequenz der schweren Kette des humanen hochmolekularen Kininogens. $\longleftrightarrow$, Fragmentlänge; $\rightarrow$, Aminosäure, die durch automatische Sequenzierung identifiziert wurde; Z, Pyroglutaminsäure; /, Überlappung, abgeleitet aus der cDNA Sequenz; Die Identifizierung der ersten 45 Aminosäurereste vom N-Terminus erfolgte nach Deblockierung des Gesamtproteins. Die Nummerierung der Spaltpeptide entspricht der Reihenfolge der Elution während der einzelnen Chromatographien.

1.2. Strukturaufklärung der leichten Kette des hochmolekularen Kininogens

Die leichte Kette des hochmolekularen Kininogens wurde zunächst N-terminal direkt ansequenziert. Das Protein war N-terminal homogen und konnte 28 Schritte im Sequenator abgebaut werden. Bis auf Position 12, die anhand eines kleineren Fragments (HF-CB2) der leichten Kette zu einem späteren Zeitpunkt aufgeklärt wurde, konnten alle Aminosäuren identifiziert werden.

S-S-A-I-G-E-I-K-E-E-T-X-V-S-P-P-H-T-S-M-A-P-A-Q-D-E-E-R-

Zur weiteren Charakterisierung war es notwendig, die leichte Kette in mehrere Bruchstücke aufzuteilen. Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung der leichten Kette (Tab. 1) konnten ca. 4 Methioninreste vorhergesagt werden. Folglich erschien eine Spaltung der Methionylbindungen am geeignetsten zu sein, um relativ große Bruchstücke zu erhalten.

1.2.1. Spaltung der leichten Kette mit Bromcyan

100 nmol der leichten Kette wurden mit Bromcyan gespalten und das Spaltgemisch durch Gelfiltration aufgetrennt (Abb. 17). Die erhaltenen Fraktionen wurden durch manuelle N-terminale Sequenzanalyse auf Homogenität geprüft. Fraktion 1 (CB 1) und Fraktion 3 (CB 5) waren N-terminal homogen und konnten direkt ansequenziert werden. Fraktion 2 enthielt 3 Peptide (CB 2+3+4) die durch Reversed Phase-HPLC nachgereinigt werden mußten (Abb. 18).

Abb. 17: HPLC der Bromcyan-Spaltung der leichten Kette des HMW Kininogens. Die Trennung erfolgte über eine Säulenkombination aus zwei Gelfiltrationssäulen TSK 3000 SW (60 cm x 0.75 cm) + I-125 (25 cm x 0.8 cm) die mit 0.1% TFA äquilibriert waren. Durchflußrate 0.5 ml/min.

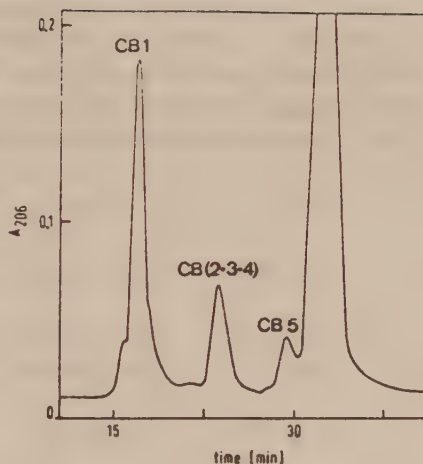
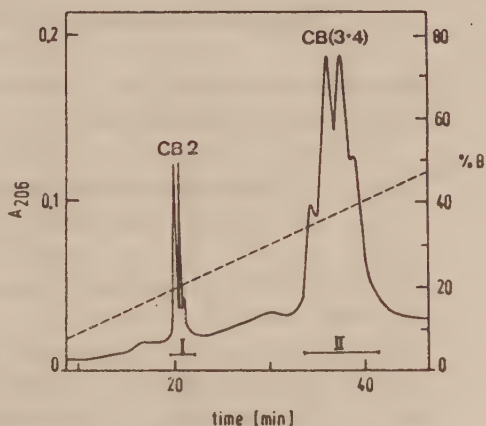


Abb. 18: Nachreinigung der Bromcyan-Fragmente aus Fraktion CB(2+3+4) der Gel-permeations-chromatographie. Verwendet wurde eine Reversed Phase-Säule Vydak TP RP (25 cm x 0.46 cm). Eluiert wurde in einem linearen Gradientensystem von 0-40% B in (A+B) in 40 min. Puffer A: 0.1% TFA in Wasser; Puffer B: 0.1% TFA in Acetonitril. Durchflußrate 2.0 ml/min



Fraktion 1 (CB 2) war N-terminal homogen. Das Auftauchen eines Doppelpeaks ist auf eine C-terminale Homoserin/Homoserin-Lacton-Heterogenität zurückzuführen. Fraktion 2 (CB 3 + CB 4) ergab beim Ansequenzieren 2 parallele Sequenzen.

CB 1	A-P-A-E-D-
CB 2	S-S-R-I-G-
CB 3	M-P-P-I-X-P-
CB 4	P-P-I-X-P-A-
CB 5	K-E-S-Y-Y-

Die homogenen Bromcyan-Peptide dienten dann als Ausgangsmaterial zur weiteren Charakterisierung.

1.2.2. Charakterisierung von Fragment CB 1

Das Bromcyanfragment CB 1 konnte N-terminal 32 Schritte direkt sequenziert werden.

CB 1	A-P-A-Q-D-E-E-R-D-S-G-K-E-Q-G-H-T-R-R-H-D- W-G-H-E-K-Q-R-K-H-N-L-
------	--

Das Peptid CB 1 überlappt dabei mit der Sequenz der gesamten leichten Kette ab Aminosäure 21. Den N-Terminus der leichten Kette bildet somit Fragment CB 2, an das sich Fragment CB 1 anschließt. Zur weiteren Aufklärung der Aminosäuresequenz wurde das Peptid CB 1 an den Arginyl- und Lysylresten mit Trypsin gespalten.

1.2.3. Trypsinspaltung von Peptid CB 1

50 nmol des Peptids wurden in 200 μ l 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8.0 gelöst und mit Trypsin gespalten. Die Auftrennung der tryptischen Fragmente erfolgte durch HPLC über eine Reversed Phase-Säule Vydak TP RP 10 (Abb. 19).

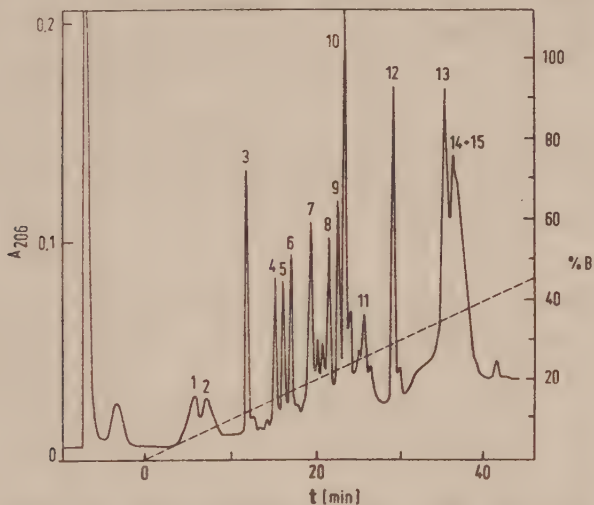
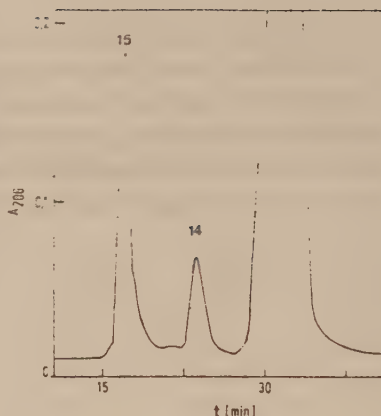


Abb. 19: HPLC der tryptischen Fragmente von Peptid CB 1. Die Trennung erfolgte auf einer Reversed Phase-Säule Vydak TP RP 10 (0.46 x 25 cm) in einem linearen Gradientensystem von 0-50% B in (A+B) in 50 min. Puffer A: 0.1% TFA in Wasser; Puffer B: 0.1% TFA in Acetonitril. Durchflußrate 2.0 ml/min.

Alle Peptide wurden nach der DABITC-Methode auf Reinheit geprüft und anschließend im Flüssigphasen-Sequenator sequenziert. Die Peptide T(CB 1)14 und T(CB 1)15 konnten über Reversed Phase-HPLC nicht getrennt werden. Ein Nachreinigung erfolgte über eine HPLC-Gelfiltrationssäule TSK 2000 SW (Abb. 20).

Abb. 20: Trennung der Peptide
 T(CB 1)14 und T(CB
 1)15 auf einer Gel-
 filtrationssäule TSK
 2000 SW (60 cm x 0.75
 cm). Eluiert wurde
 mit 0.1% TFA.
 Durchflußrate 0.5
 ml/min.



T(CB 1)1	H-G-H-G-H-G-K
T(CB 1)2	E-Q-G-H-T-R
T(CB 1)3	N-Q-G-H-G-H-
T(CB 1)4	A-P-A-Q-D-E-E-R
T(CB 1)5	H-N-L-G-H-G-H-K
T(CB 1)6	K-H-N-L-G-H-G-H-K
T(CB 1)7	H(N-G-W-K)
T(CB 1)8	H-N-W-G-H-E-K
T(CB 1)9	R-H-N-W-G-H-E-K
T(CB 1)10	G-H-G-L-
T(CB 1)11	T-E-H-L-A-S-S-S-E-D-
T(CB 1)12	L-D-D-D-L-E-H-Q-G-G-H-V-L-D-H-G-H-K
T(CB 1)13	F-K-L-D-D-D-D-L-E-
T(CB 1)14	P-G-V-X-V-T-F-S-D-F-Q-D-S-D-L-I-A-X-M-Hser
T(CB 1)15	T-E-H-A-S-S-S-E-D-S-T-X-P-S-A-Q-T-Q-E-K-X- E-G-P-X-P-I-P-S-L-A-K-

Bei den Peptiden T(CB 1)14 und T(CB 1)15 konnten nicht alle Aminosäuren identifiziert werden. Da die Aminosäureanalyse beider Peptide Galaktosamin aufwies, konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei den nicht identifizierten Aminosäuren um Kohlenhydratbindungsstellen handelte. Folglich wurde ein Aliquot beider Peptide mit Flußsäure behandelt und anschließend nochmals sequenziert. Die Ausbeuten der Abspaltreaktion waren sehr gering, sodaß nicht

alle Kohlenhydratbindungsstellen im Sequenator eindeutig identifiziert werden konnten, zumal bei den O-glycosidischen Bindungsstellen Serin oder Threonin identifiziert werden mußte, zwei Aminosäuren, deren PTH-Derivate relativ instabil sind. Aminosäuren, die nicht mit absoluter Sicherheit identifiziert werden konnten, wurden deshalb in Klammern dargestellt. Die Aminosäure in Position 18 des Peptids HF-T(CB 1)14 wurde anhand eines Überlappungspeptids (HF D-1) zu einem späteren Zeitpunkt identifiziert.

HF-T(CB 1)14 P-G-V-(T)-V-T-F-S-D-F-Q-D-S-D-L-I-A-X-Hser
 HF-T(CB 1)15 T-E-H-A-S-S-S-E-D-S-T-(T)-P-S-A-Q-T-Q-E-K-
 (T)-E-G-P-(T)-P-

Die Charakterisierung des Bromcyan-Peptids CB 1 erwies sich als aufschlußreich hinsichtlich der Bromcyanspaltbedingungen. Bei der Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches über Reversed Phase-HPLC wurde das Eluat parallel bei 206 nm und bei 280 nm gemessen. Dabei konnte ein Bereich gefunden werden, der bei 280 nm eine große Anzahl kleiner Peaks enthielt. Das Peptidmaterial dieser Peaks war jedoch für eine Sequenzanalyse zu gering. Da es sich ausschliesslich um Peptide mit aromatischen Aminosäuren handelte, wurde angenommen, daß durch ungeeignete Spaltbedingungen Heterogenitäten bei tryptophanhaltigen Peptiden geschaffen wurden. Die Inkubationszeit der Bromcyanspaltung wurde daraufhin von 18 Stunden auf 1 Stunde reduziert, und das Bruchstück CB 1 wieder tryptisch nachgespalten. Bei der neuerlichen Auftrennung über Reversed Phase-HPLC konnten daraufhin die 3 tryptophanhaltigen Peptide T(CB 1)7, T(CB 1)8 und T(CB 1)9 identifiziert werden (Abb. 21).

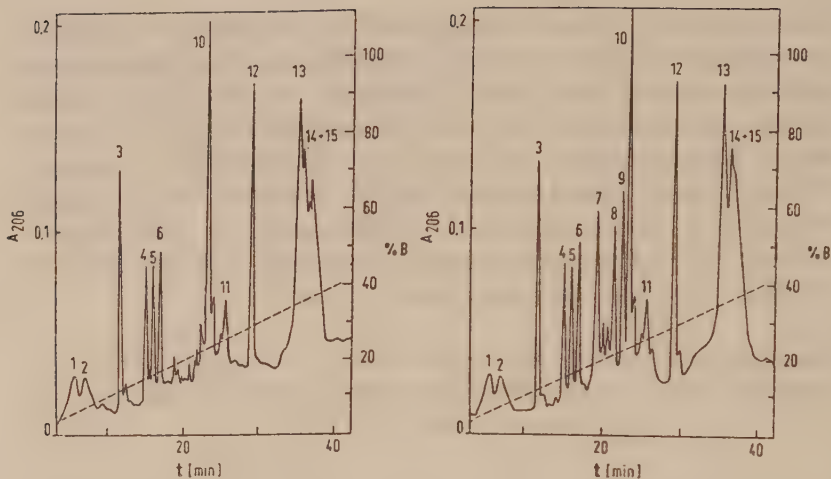
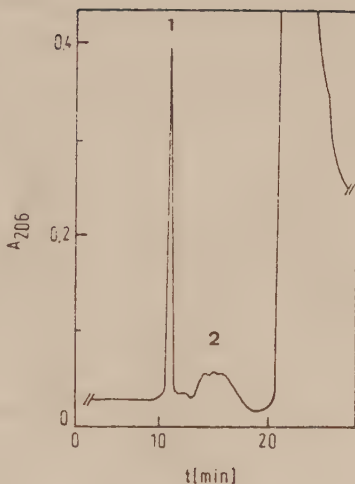


Abb. 21: Vergleich der Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches von Bromcyan-Bruchstück CB 1 nach 18 stündiger (A) und nach 1 stündiger Spaltdauer (B). Chromatographiebedingungen wie bei Abb. 21.

1.2.4. Spaltung von Fragment CB 1 mit Trypsin nach Blockierung der Lysinreste durch Citraconsäureanhydrid.

Da mehrere tryptische Bruchstücke kein Arginin enthielten, konnte davon ausgegangen werden, daß eine spezifische Spaltung an den Argininresten ein relativ großes Bruchstück ergeben würde. Das Peptid CB 1 wurde dazu mit Citraconsäureanhydrid an den Lysinresten blockiert, und anschließend tryptisch gespalten. Nach der Deblockierung der Lysine wurde das Peptidgemisch gelchromatographisch aufgetrennt (Abb. 23).

Abb. 22: Gelchromatographische Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches durch HPLC. Säule: TSK 2000 SW (60 cm x 0.75 cm). Die Elution erfolgte mit 0.1 % TFA bei einer Durchflußrate von 0.7 ml/min.



Da nur große Peptide von Nutzen waren, wurde nur das Peptid CT(CB 1)1 N-terminal 27 Schritte ansequenziert.

CT(CB 1)1 G-H-G-L-G-H-G-H-E-Q-Q-H-G-L-G-H-G-H-K-
 F-K-L-D-D-D-L-E-

1.2.5. Thermolysinspaltung des Bromcyanpeptids CB 1

Um Überlappungspeptide für die bisher identifizierten tryptischen Peptide zu erhalten, wurde das Bromcyanpeptid CB 1 mit Thermolysin gespalten. Das Peptidgemisch wurde mittels Gelpermeationschromatographie aufgetrennt (Abb. 23). Da als Überlappungspeptide nur relativ große Bruchstücke geeignet sind, wurden nicht alle Peptide dieser Auftrennung charakterisiert. Fraktion 1-3 wurden durch Reversed Phase-HPLC nachgereinigt (Abb. 24).

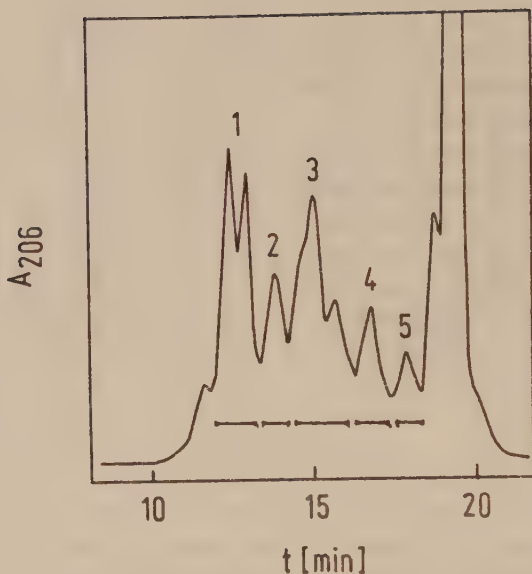


Abb. 23: Gelchromatographie des thermolytischen Spaltgemisches des Bromcyanpeptids CB 1. Säule: TSK 2000 SW. Die Elution erfolgte in 0.1 % TFA bei einer Durchflußrate von 0.5 ml/min.

Die gepoolten Fraktionen sind durch Balken gekennzeichnet und wurden über Reversed Phase HPLC weiter nachgereinigt.

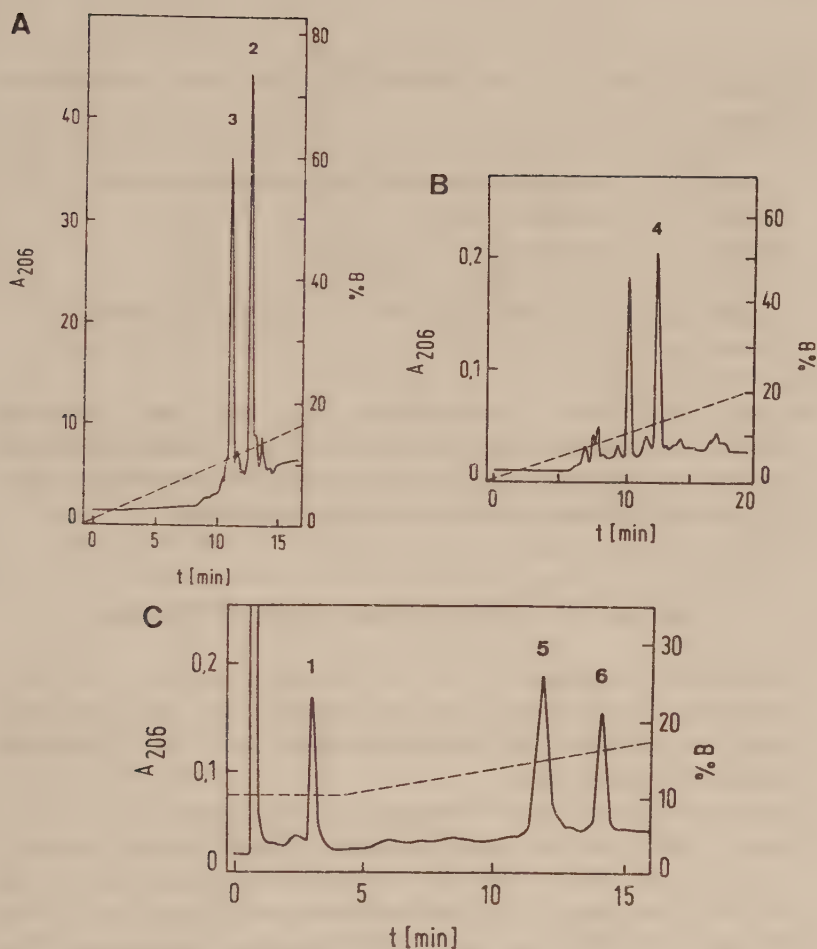


Abb. 24: Reversed Phase-HPLC der einzelnen Fraktionen der gelchromatographischen Vortrennung des thermolytischen Spaltgemisches. (A), Fraktion 1, (B), Fraktion 2; (C), Fraktion 3. Säule: Vydak TP RP 10 (25 cm x 0.46 cm). Puffer A: 0.1 % TFA; Puffer B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchfluß: 2.0 ml/min.

Es konnten dabei folgende Peptide isoliert und sequenziert werden.

TL(CB 1)1	L-G-H-G-H-K-H-E-E-R-D-Q-G-H-G-H-Q-R-G-H-
TL(CB 1)2	L-G-H-G-H-E-Q-Q-
TL(CB 1)3	L-G-H-G-K-F
TL(CB 1)4	V-L-D-H-G-H-K-H-K-H-
TL(CB 1)5	G-H-G-H-G-K-H-K-N-K-G-K-K(N-G-K-H-N-G-W)
TL(CB 1)6	A-P-A-Q-

Da auch mit dieser Spaltung nur ein Teil der größeren Überlappungspeptide isoliert werden konnte, wurde das Peptid CB 1 an den Asparaginsäure- und an den Glutaminsäureresten mit *Staphylococcus aureus*-Protease V8 gespalten.

1.2.6. Spaltung mit *Staphylococcus aureus*-V8 Protease

Das Peptid CB 1 wurde in 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.8, gelöst und mit V8-Protease gespalten. Das Peptidgemisch wurde durch Reversed Phase-HPLC auf einer C 18-Säule aufgetrennt (Abb. 25).

Die erhaltenen Peptide wurden manuell ansequenziert. Dabei konnte jedoch nur ein Teil der Peaks identifiziert werden, da vermutlich einige Peptide N-terminal blockiert waren. Es existiert mehrmals die Aminosäuresequenz Asp-Gln oder Glu-Gln. Bei einer Spaltung mit V8 Protease C-terminal von Asp oder Glu entstehen mehrere Peptide mit Glutamin als N-terminaler Aminosäure. Diese wiederum kann unter geeigneten Bedingungen zur Pyroglutaminsäure umgewandelt werden, die für den Edman-Abbau nicht zugänglich ist. So kann zwar durch Aminosäureanalyse Peptidmaterial nachgewiesen werden, jedoch kann keine N-terminale Aminosäure ermittelt werden. Aus dem Peptidgemisch konnten mehrere Peptide charakterisiert werden. Jedoch nur Peptid D(CB 1)14 eignete sich als Überlappungspeptid.

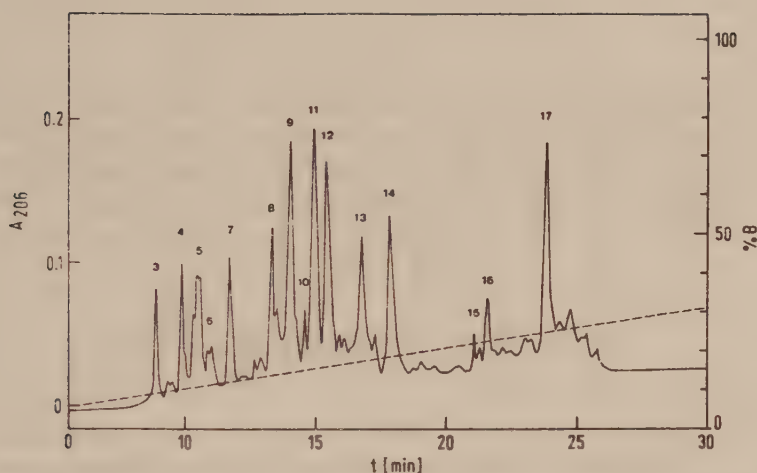


Abb. 25: HPLC der V8 Protease-Spaltung von Peptid CB 1. Die Trennung erfolgte auf einer Reversed Phase-Säule Vydac TP RP 10 (25 cm X 0.46 cm) mit einem linearen Gradienten von 0-60 % B in (A+B) in 60 min. Puffer A: 0.1 % TFA; Puffer B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchflußrate 2.0 ml/min.

D(CB 1)4	R-D-Q-G-H-G-H-Q-R-
D(CB 1)5	S-T-T-
D(CB 1)7	H-L-A-S-S-E-D
D(CB 1)9	K-Q-R-K-H-N-L-G-H-G-H-K-H-E
D(CB 1)11	Q-G-H-T-
D(CB 1)12	H-Q-G-G-H-V-L-D
D(CB 1)14	H-G-H-K-H-K-H-G-H-G-

Für zwei noch fehlende Überlappungen schien eine Spaltung der Glutamylobindungen am geeignetsten zu sein. Dazu wurde das Peptid CB 1 in 0.1 M Ammoniumbicarbonat-Puffer pH 7.8 gelöst und mit V8 Protease gespalten. Das Peptidgemisch wurde durch Gelpermeationschromatographie vorgetrennt (Abb. 27).

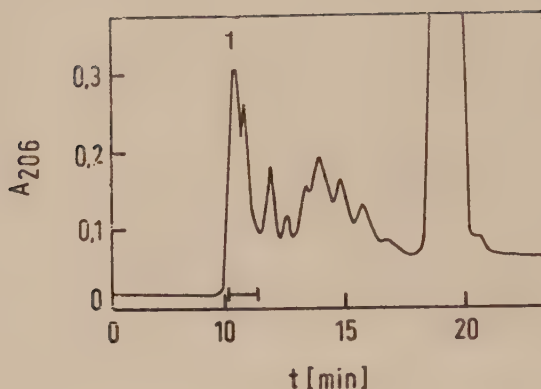


Abb. 26: HPLC des *Staphylococcus aureus* V8-Protease-Spaltgemisches auf einer Gelfiltrationssäule TSK 2000 SW. Die Elution erfolgte in 0.1 % TFA bei einem Durchfluß von 0.5 ml/min.

Fraktion 2 der Gelchromatographie wurde über Reversed Phase-HPLC nachgereinigt und anschließend sequenziert. Nicht identifizierte Aminosäuren wurden anhand der tryptischen Fragmente aufgeklärt (HF-T(CB 1)14 und HF-T(CB 1)15).

E(CB 1)1 R-D-Q-G-H-G-H-Q-R-G-H-G-

E(CB 1)2 K-X-E-G-P-X-P-I-P-S-L-A-K-P-G-V-X-V-T-F-X-D-

Als problematisch hinsichtlich der Sequenzanalyse erwies sich der Sequenzabschnitt von Aminosäure 124 bis 130. Bei der Sequenzierung des Peptids TL(CB 1)1 fiel die Ausbeute an PTH-Aminosäure im achten Schritt nahezu auf Null ab. Das gleiche Problem ergab sich beim Sequenzieren des tryptischen Peptids T(CB 1)7. Aus dem noch verbleibenden Anteil an PTH-Aminosäuren und den Aminosäureanalysen dieser Peptide konnte als Ursache für das Absinken der Ausbeute zwei aufeinanderfolgende Asn-Gly Sequenzen angenommen werden. Aus Arbeiten von Bornstein (1970) ist bekannt, daß bei der Sequenzfolge Asn-Gly eine Isopeptid-Bindung entstehen kann,

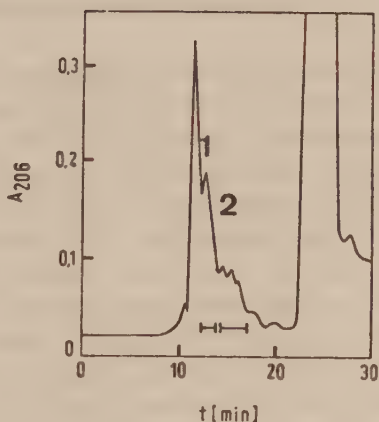
das heißt eine Peptidbindung mit der β -Aminogruppe des Asparagins. Diese Konstitution ist dann für den Edman-Abbau nicht mehr zugänglich (Hermodson et al., 1972; Gilles et al., 1984). Die Asparaginyl-Glycyl Bindung ist jedoch mit Hydroxylamin spaltbar.

1.2.7. Spaltung mit Hydroxylamin

Das Peptid CB 1 wurde mit Hydroxylamin gespalten und anschließend gelchromatographisch aufgetrennt (Abb. 27). Das Peptid HA(CB 1)2 konnte jedoch nur mit schlechter Ausbeute gereinigt werden und somit nicht eindeutig sequenziert werden. Die Sequenz in diesem Bereich ist deshalb in Klammern dargestellt.

HA(CB 1)2 (G-W-K-T-E-H)-

Abb.27: Auftrennung des Hydroxylamin-Spaltgemisches. Die Trennung erfolgte auf einer HPLC Gelfiltrationssäule TSK 3000 SW (60 cm x 0.7 cm), die mit 0.1% TFA Äquilibriert war. Der Durchfluß betrug 0.5 ml/min.



Aus den oben aufgeführten Spaltungen konnte die gesamte

Sequenz des Bromcyanpeptids CB 1 ermittelt werden. Es besteht aus 223 Aminosäuren und enthält 4 Kohlenhydratseitenketten, die alle O-glycosidisch gebunden sind. Die Zuordnung der ermittelten Peptide zur Gesamtsequenz ist aus Abbildung 32 (S.62) ersichtlich.

1.2.8. Charakterisierung des Bromcyan-Peptids CB 2

Das Peptid CB 2 konnte direkt durchsequenziert werden. Es besteht aus 20 Aminosäuren und ist mit der N-terminalen Sequenz der leichten Kette identisch. Zunächst konnte in Position 12 keine Aminosäure identifiziert werden. Nach Behandlung mit Flußsäure konnte jedoch in dieser Position ein Threonin ermittelt werden.

CB 2	S-S-R-I-G-E-I-K-E-E-T-X-V-S-P-P-H-T-S-Hser
HF-CB 2	S-S-R-I-G-E-I-K-E-E-T-T-V-S-P-P-

1.2.9. Charakterisierung der Bromcyan-Peptide CB 3 und CB 4

Wie bereits gezeigt, unterscheiden sich die beiden Peptide CB 3 und CB 4 nur durch ein zusätzliches Methionin am N-Terminus von CB 4. Da diese beiden Peptide nicht getrennt werden konnten, war es nötig, die Sequenzierung im Pool durchzuführen. Da die erste Aminosäure von CB 3 ein Prolin ist, war es möglich, alle anderen Sequenzen mit o-Phthaldialdehyd abzublockieren. Durch die Direktsequenz konnten 23 Aminosäuren ermittelt werden. Der drastische Abfall der Ausbeute an PTH-Aminosäure nach Position 23 konnte später auf eine weitere, bereits diskutierte Asn-Gly Sequenz zurückgeführt werden. Die Aminosäuren in Position 4 und Position 20 konnten erst nach Flußsäure-Behandlung identifiziert werden.

CB 3	P-P-I-X-P-A-P-I-Q-S-D-D-D-W-I-P-D-I-Q-X-D-P-N-
HF-CB 3	P-P-I-S-P-A-P-I-Q-S-D-D-D-W-I-P-D-I-Q-T-D-P-

1.2.10. Säurespaltung

Da in Position 21 und 22 eine Asparaginyll-Prolyl-Bindung vorlag, wurde mit dem Peptidgemisch CB 3 und CB 4 eine Säurespaltung durchgeführt. Die Auftrennung des Spaltansatzes erfolgte über eine Reversed Phase Säule Vydac TP RP (Abb. 28).

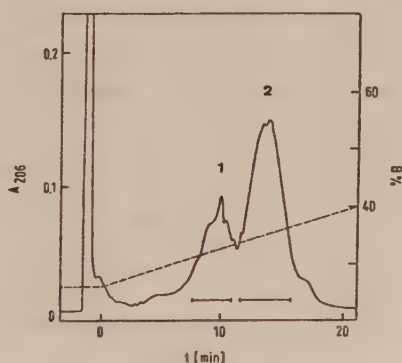
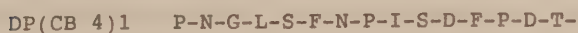


Abb. 28: Reversed Phase-Chromatographie nach der Säurespaltung der Bromcyanpeptide CB 3 und CB 4. Die Trennung erfolgte auf einer Vydac TP RP 10-Säule (25 cm x 0.46 cm). Puffer A: 0.1 % TFA; Puffer B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchflußrate 2.0 ml/min.

Fraktion 1 war homogen und enthielt das Peptid DP(CB 4)1. Fraktion 2 war heterogen und enthielt wiederum den N-Terminus der beiden Peptide CB 3 und CB 4.



1.2.11. Hydroxylamin-Spaltung

Da in Position 24/25 ein Asparaginyll-Glycyl-Bindung vorliegt, konnte mit Hydroxylamin gespalten werden. Die Auftrennung über eine Reversed Phase-Säule ergab ähnlich wie nach der Säurespaltung 2 Fraktionen (Abb. 29), von denen eine den heterogenen N-Terminus, die andere das homogene Bruchstück HA(CB 4)1 enthielt.

HA(CB 4)1 G-L-S-F-N-P-I-S-D-F-P-D-T-T-S-P-K-C-P-G-
R-P-W-K-S-V-

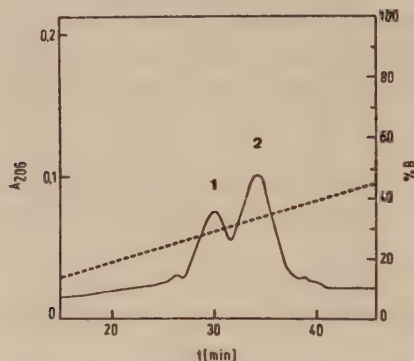


Abb. 29: Reversed Phase-Chromatographie des Hydroxylamin-Spaltgemisches. Säule: Vydac TP RP 18 (25 cm x 0.7 cm). Puffer A: 0.1 % TFA; Puffer B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchflußrate: 2.0 ml/min.

1.2.12. Trypsin-Spaltung

Da keines der bisher gereinigten Peptide bis zum C-terminalen Homoserin durchsequenziert werden konnte, war es notwendig, eine tryptische Spaltung der Peptide CB 3 und CB 4 durchzuführen. Die Peptide wurden mittels Reversed Phase-HPLC gereinigt (Abb. 30) und im Flüssigphasensequenzator sequenziert.

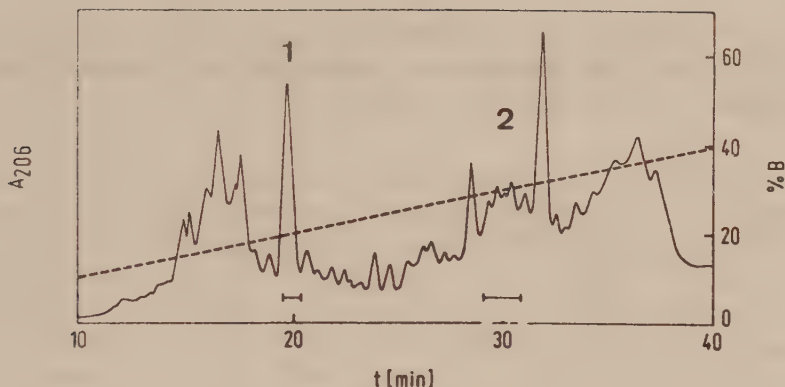


Abb. 30: Reversed Phase-Chromatographie der tryptischen Spaltung der Peptide CB 3 und CB 4. Säule: Vydac TP RP 18 (25 cm x 0.46 cm). Puffer A: 0.1 % TFA; Puffer B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Durchflußrate: 2.0 ml/min.

T(CB 3)1 C-P-G-R-P-W-K

T(CB 3)2 S-V-S-E-I-N-P-T-T-Q-Hser

1.2.13. Charakterisierung des Bromcyanpeptids CB 5

Die Aminosäureanalyse des Peptids CB 5 enthielt kein Homoserin und konnte deshalb als C-terminales Peptid der leichten Kette angenommen werden. Das Peptid konnte 13 Schritte bis zum C-Terminus sequenziert werden.

CB 5 K-E-S-Y-Y-F-D-L-T-D-G-L-S

Zur Bestätigung der C-terminalen Sequenz wurde das Peptid CB 5 mit Carboxypeptidase Y inkubiert und die Freisetzung der Aminosäuren vom C-Terminus in Abhängigkeit der Inkubationszeit gemessen (Abb. 31). Die am schnellsten freigesetzten Aminosäuren Serin, Leucin und Glycin. Dies bedeutet, daß

Serin wirklich die C-terminale Aminosäure ist. Der Zeitverlauf der Freisetzung entspricht der Sequenz des Peptids CB 5 von rückwärts gelesen.

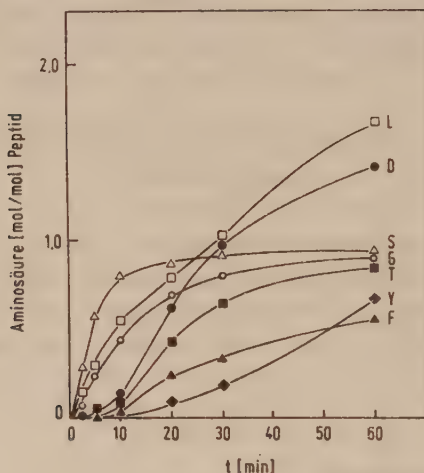


Abb. 31: Freisetzung von Aminosäuren nach Inkubation des Fragments CB 5 mit Carboxypeptidase Y.

1.2.14. Verknüpfung der Bromcyanpeptide CB1, CB3/4 und CB5

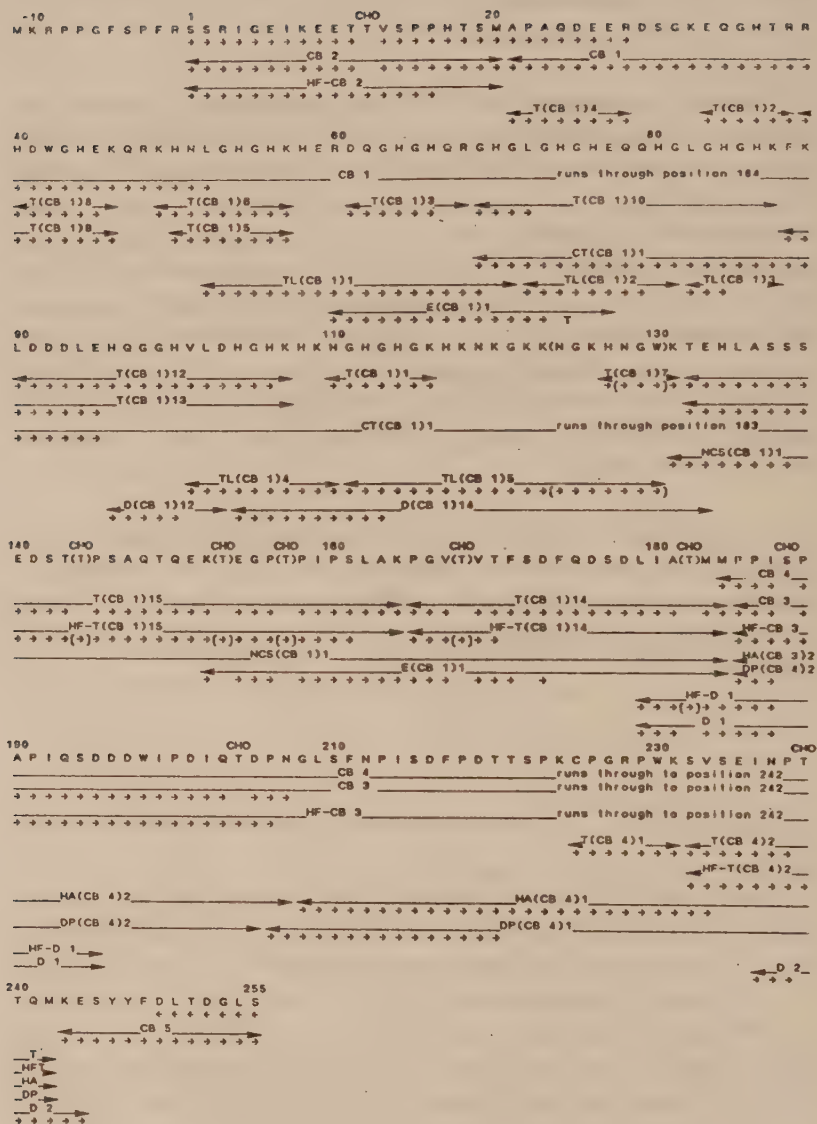
Da Peptid CB 2 mit der N-terminalen Sequenz übereinstimmt, die in Peptid CB 1 fortgesetzt wird, und Peptid CB 5 das C-terminale Fragment darstellt, mußte CB 3/4 zwischen CB 1 und CB 5 einzuordnen sein. Zur Bestätigung wurde die gesamte leichte Kette mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease gespalten. Das Peptidgemisch wurde über Reversed Phase-HPLC aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen durch ihre Aminosäureanalyse charakterisiert. Sequenziert wurden solche Peptide, die einen Methioninrest enthielten.

D 1	L-I-A-X-M-M-P-P-I-
HF-D 1	L-I-A-T-M-M-P-P-I-
D 2	I-N-P-X-T-Q-M-K-E

Die beiden sequenzierten Peptide enthielten jeweils in Position 4 eine Aminosäure, die nicht identifiziert werden konnte. D 1 überlappte mit dem C-terminalen Bereich von T(CB 1)14, bei dem die Aminosäure in Position 18 nicht identifiziert werden konnte. Die beiden unbekannten Aminosäuren befanden sich in der Gesamtsequenz in der gleichen Position. D 1 wurde deshalb mit Flußsäure behandelt und nochmals sequenziert. Die fehlende Aminosäure konnte als Threonin identifiziert werden und stellte somit eine Kohlenhydratbindungsstelle dar. Die fehlende Position in D 2 konnte bereits in Peptid HF-T(CB 4)2 als Threonin identifiziert werden.

Die Gesamtsequenz der leichten Kette des HMW Kininogens ist somit aus 255 Aminosäuren aufgebaut (Abb. 32). Es konnten 9 Kohlenhydratbindungsstellen identifiziert werden. Alle Kohlenhydrate sind O-glycosidisch an Serin oder Threonin gebunden.

Abb. 32: (Seite 62) Aminosäuresequenz der leichten Kette (Pos. 1-255) und des Kininfragments (Pos -10 bis 0) des HMW Kininogens. Die Numerierung entspricht den Positionen der Aminosäuren in der leichten Kette. $\longleftrightarrow$, Fragmentlänge; $\rightarrow$, Aminosäuren, die durch automatischem Edman Abbau sequenziert wurden. $\leftarrow$, Aminosäurereste, die durch Carboxypeptidase-Abbau bestätigt wurden. Die ungespaltene leichte Kette wurde nicht durch Peptidpfeile gekennzeichnet.



1 Q E S Q S E E I D C N D K D L F K A V D A A L K K Y N S Q N
 31 Q S N N Q F V L Y R I T E A T K T V G S D T F Y S F K Y E I
 61 K E G D C P V Q S G K T W Q D C E Y K D A A K A A T G E C T
 91 A T V G K R S S T K F S V A T Q T C Q I T P A E G P V V T A
 121 Q Y E C L G C V H P I S T Q S P D L E P I L R H G I Q Y F N
 151 N N T Q H S S L F M L N E V K R A Q R Q V V A G L N F R I T
 181 Y S I V Q T N C S K E N F L F L T P D C K D L W N G D T G E
 211 C T D N A Y I D I Q L R I A S F S Q N C D I Y P G K D F V Q
 241 P P T K I C V G C P R D I P T N S P E L E E T L T H T I T K
 271 L N A E N N A T F Y F K I D N V K G A R V Q V V A G G R Y F
 301 I D F V A R E T T C S K E S N E E L T K S C E T K K L G Q S
 331 L D C N A E V Y V V P W E K K I Y P T V N C Q P L G M I S L
 361 M K R P P G F S P F R S S R I G E I K E E T T V S P P H T S
 391 M A P A Q D E E R D S G K E Q G H T R R R H D W G H E K Q R K
 421 H N L G H G H K H E R D Q G H G H Q R G H G L G H G H E Q Q
 451 H G L G H G H K F K L D D D L E H Q G G H V L D H G H K H K
 481 H G H G H G K H K N K G K K N G K H N G W K T E H L A S S S
 511 E D S T T P S A Q T Q E K T E G P T P I P S L A K P G V T V
 541 T F S D F Q D S D L I A T M M P P I S P A P I Q S D D D W I
 571 P D I Q T D P N G L S F N P I S D F P D T T S P K C P G R P
 601 W K S V S E I N P T T Q M K E S Y Y F D L T D G L S

Abb. 33: Gesamtsequenz des menschlichen hochmolekularen
 Kininogens, aufgebaut aus der schweren Kette
 (Aminosäure 1-362), dem Kininfragment (Aminosäure
 363-371, unterstrichen) und der leichten Kette
 (Aminosäure 372-626);

2. Niedermolekulares Kininogen

Das niedermolekulare Kininogen wurde seiner physiologischen Spaltbarkeit entsprechend durch limitierte Proteolyse mit Kallikrein in schwere Kette, leichte Kette und Lysyl-Bradykinin gespalten. Da leichte Kette und schwere Kette über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, wurde das Spaltgemisch reduziert und mit Jodessigsäure carboxymethyliert.

Die Auftrennung der drei Fragmente erfolgte durch Hochdruck-flüssigkeits-Chromatographie über eine Reversed Phase-Säule Vydac TP RP 18 (Abb. 34)

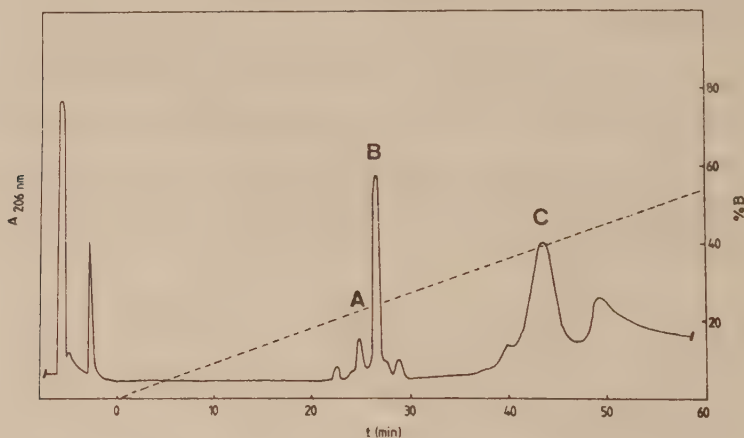


Abb. 34: Reversed Phase-HPLC der Spaltprodukte von niedermolekularem Kininogen nach limitierter Proteolyse durch Gewebekallikrein: Säule: Vydac TP RP 18 (0.46 x 25 cm); Puffer: A, 0.04 % TFA in Wasser; B, 0.04 %TFA in Acetonitril; Gradient: 0-55 % B in (A+B) in 65 min; Durchfluß: 1.5 ml/min.

Manuelle N-terminale Analysen mit der DABITC-Methode zeigte folgende N-Termini:

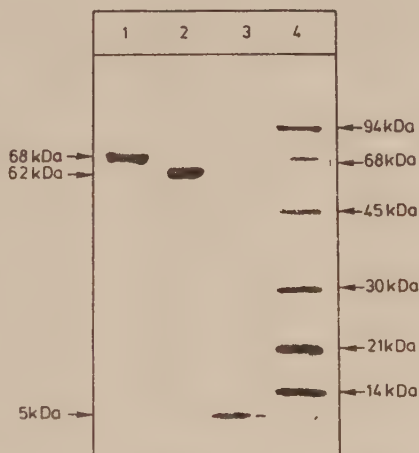
Fraktion A: Lys-Arg-Pro-Pro-

Fraktion B: Ser-Ser-Arg-Ile-

Fraktion C: keine N-terminale Aminosäure

Fraktion A enthielt Lysyl-Bradykinin. Die Fraktionen B und C wurden elektrophoretisch im SDS-Gel untersucht (Abb. 35). Fraktion B enthielt die leichte Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 5 kD und Fraktion C die schwere Kette mit einem Molgewicht von 62 kD in reiner Form.

Abb. 35: Lineares 10-15 % SDS-Gel (Laemmli, 1970) der durch HPLC isolierten leichten und schweren Ketten aus Abbildung 34: Ungespaltenes niedermolekulares Kininogen (1), schwere Kette entsprechend der Fraktion C (2), leichte Kette entsprechend der Fraktion B (3), Eichproteine (4).



Ein Aliquot jeder Fraktion wurde zur Aminosäureanalyse verwendet.

Tab. 2: Aminosäureanalyse des LMW Kininogens (LMWK) und der Spaltprodukte nach Spaltung mit Plasmakallikrein. In Klammern die Anzahl der Aminosäuren aus der Sequenzanalyse. Tryptophan wurde nicht bestimmt (n.d.). GluNac und GalNac wurden nicht quantitativ bestimmt.

Aminosäure	LMWK	schwere Kette	leichte Kette	Kinin
Cys (Cm)	12.4 (18)	11.9 (17)	1.2 (1)	
Asx Asn	43.4 (23)	43.8 (23)		
Asp	(20)	(20)		
Ser	41.2 (31)	20.5 (25)	5.8 (6)	1.3 (1)
Thr	46.4 (34)	27.0 (32)	2.1 (2)	
Glx Glu	55.6 (33)	47.8 (25)	7.2 (7)	
Gln*	(22)	(22)		
Pro	15.4 (19)	13.9 (16)	2.9 (3)	2.5 (3)
Gly	19.5 (19)	16.5 (16)	2.9 (3)	1.4 (1)
Ala	28.2 (28)	21.9 (22)	2.9 (3)	
Val	25.5 (26)	23.9 (24)	1.0 (1)	
Met	2.5 (3)	2.6 (3)		
Ile	21.7 (22)	20.1 (20)	1.8 (2)	
Leu	22.3 (22)	21.2 (21)	1.1 (1)	
Tyr	15.4 (15)	13.5 (14)	1.1 (1)	
Phe	17.6 (18)	15.7 (16)		1.7 (2)
Lys	32.4 (32)	28.8 (29)	3.0 (3)	
His	4.7 (5)	3.5 (4)	1.1 (1)	
Arg	15.9 (16)	9.6 (10)	3.9 (4)	1.9 (2)
Trp	n.d. (3)	n.d. (3)	n.d.	
Total	409	362	38	9
GluNac	+	+	-	-
GalNac	-	-	-	-

2.1. Sequenzierung der leichten Kette des niedermolekularen Kininogens.

Die Aminosäureanalyse der leichten Kette enthielt keine Aminosucker, sodaß davon ausgegangen werden konnte, daß die leichte Kette frei von Kohlenhydratseitenketten ist (Tabelle 2).

Durch die N-terminale Sequenzanalyse von 4 nmol der gesamten leichten Kette konnten 37 Aminosäuren direkt identifiziert werden. Zur Aufklärung des C-terminalen Teils der leichten Kette wurden 20 nmol Peptid tryptisch gespalten. Das Peptidgemisch wurde durch HPLC über eine Reversed Phase-Säule Hibar LiChrosorb RP-18 aufgetrennt (Abb. 36). 10 % jeder Fraktion wurde zur Aminosäureanalyse (Tab. 3) und nochmals 10 % zur manuellen N-terminalen Sequenzanalyse (DABITC) verwendet.

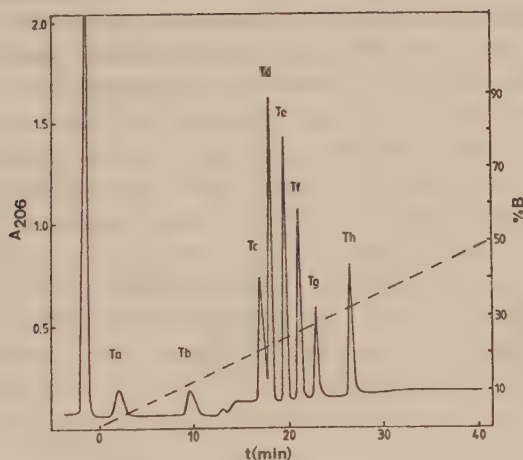


Abb. 36: HPLC des tryptischen Spaltgemisches der leichten Kette des niedermolekularen Kininogens. Säule: LiChrosorb RP 18 (0.46 x 25 cm); Puffer: A, 0.1 % TFA in Wasser; B, 0.1 % TFA in Acetonitril; Gradient: 0-50 % B in (A+B) in 40 min; Durchflußrate: 1.5 ml/min.

Da Fragment Tb weder Lysin noch Arginin enthielt, konnte davon ausgegangen werden, daß es das C-terminale Fragment war. Da es laut Aminosäureanalyse aus 3 Aminosäuren bestand, wurden 15 nmol dieses Peptides zwei Schritte manuell abgebaut. Da restliche Material wurde in Citratpuffer, pH 2.2, gelöst und direkt durch Aminosäureanalyse identifiziert. Aus dem Vorhandensein von freiem Serin konnte geschlossen werden, daß Serin die C-terminale Aminosäure darstellt. Die Ausbeute an Serin betrug 73 % des eingesetzten Peptids.

Tab. 3: Aminosäureanalyse der leichten Kette (LC) des niedermolekularen Kininogens und der Fragmente der tryptischen Spaltung (Ta-Th). Cystein wurde als S-Carboxymethylcystein bestimmt. In Klammern Werte aus der Sequenzanalyse. Tryptophan wurde nicht bestimmt. DABITC, manuelle Sequenzanalyse.

	LC	Ta	Tb	Tc	Td	Te	Tf	Tg	Th
Cys(Cm)	1.2(1)								
Asx									
Ser	5.8(6)	1.8(2)	0.9(1)		0.9(1)	0.8(1)	1.0(1)		1.1(1)
Thr	2.1(2)								
Glx Glu	7.2(7)		1.0(1)		2.2(2)	1.1(1)	2.0(2)	1.2(1)	3.2(3)
Pro	2.9(3)			2.0(2)	0.8(1)				
Gly	2.9(3)			1.0(1)	1.1(1)			1.1(1)	1.1(1)
Ala	2.9(3)				2.6(3)				
Val	1.0(1)		1.1(1)						
Met									
Ile	1.8(2)							1.8(2)	1.9(2)
Leu	1.1(1)						1.1(1)		1.1(1)
Tyr	1.1(1)					1.0(1)			
Phe									
Lys	3.0(3)			1.1(1)		0.9(1)		0.9(1)	0.9(1)
His	1.1(1)						1.0(1)		1.0(1)
Arg	3.9(4)	1.0(1)		1.0(1)	1.0(1)		1.0(1)		1.0(1)
Total	38	3	3	5	9	5	8	5	13
DABITC	SSRIG	SSR	EVS	GRPPK	AGAEP	SCEYK	EETTS	IGEIK	IGEIK

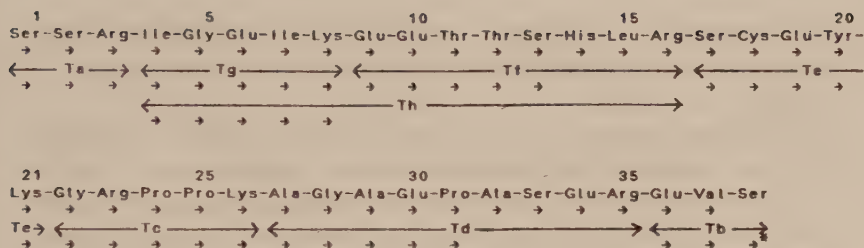


Abb. 37: Aminosäuresequenz der leichten Kette des niedermolekularen Kininogens. T, Peptide, die nach tryptischer Spaltung isoliert wurden. *, Aminosäurerest, der wie oben beschrieben durch Aminosäureanalyse identifiziert wurde.

Die komplette Aminosäuresequenz (Abb. 37) der leichten Kette des niedermolekularen Kininogens besteht aus 38 Aminosäuren. Sie enthält keine Kohlenhydratseitenketten. Der einzige Cysteinrest in Position 18 bildet eine Disulfidbrücke mit der schweren Kette.

Da die Ergebnisse der Aminosäureanalysen und der SDS-Gelelektrophorese darauf hinwiesen, daß die schweren Ketten von LMW- und HMW-Kininogen identisch sein könnten, wurde auf eine vollständige Sequenzierung der schweren Kette des LMW-Kininogens verzichtet. Diese Vermutung wurde durch die Aufklärung der cDNA-Sequenz (Takagaki et al., 1985) bestätigt. Die proteinchemische Charakterisierung der schweren Kette des niedermolekularen Kininogens erfolgte deshalb parallel mit der Aufklärung der Lage der Disulfidbrücken (Kellermann et al., 1987).

2.2. Charakterisierung der schweren Kette und Aufklärung der Lage der Disulfidbrücken im niedermolekularen Kininogen

Cystein und Cystinreste sind von entscheidender Bedeutung für die Struktur von Proteinen. Gerade Cysteinreste stellen in vielen Fällen die reaktivste Seitengruppe eines Proteins dar, die leicht oxidiert oder anderweitig modifiziert werden kann. Disulfidgruppen dagegen tragen zur Stabilisierung der räumlichen Struktur entscheidend bei.

Es stellte sich also nach der Ermittlung der Aminosäuresequenz der Kininogene, bei der 18 Cysteinreste identifiziert werden konnten, die Aufgabe, die Verknüpfung dieser Reste aufzuklären. Das unreduzierte Protein muß dazu so gespalten werden, daß disulfidverknüpfte Fragmente als Doppelsequenz identifiziert werden können.

Um die Reinigung der kleineren disulfidverknüpften Fragmente zu erleichtern, wurde zunächst versucht, mit möglichst großen Bruchstücken eine Vorfragmentierung des Gesamtproteins zu erreichen. Dazu wurde niedermolekulares Kininogen durch limitierte Proteolyse mit Trypsin gespalten (*Salvesen et al., 1986*) und das Spaltgemisch durch Gelfiltration aufgetrennt.

Es konnten Bradykinin (Position 363-371) und 2 große Fragmente mit Molekulargewichten von 45 kD und 21 kD isoliert werden. Die beiden Fragmente wurden durch N-terminale Sequenzanalyse charakterisiert. Das größere Fragment, das als F1-2 bezeichnet wurde, erstreckt sich von Aminosäure 1-244. Dieses Peptid ist über eine Disulfidbrücke mit der leichten Kette (Position 372-409) des niedermolekularen Kininogens verbunden. Das kleinere Fragment F3 erstreckt sich von Aminosäure 245-362.

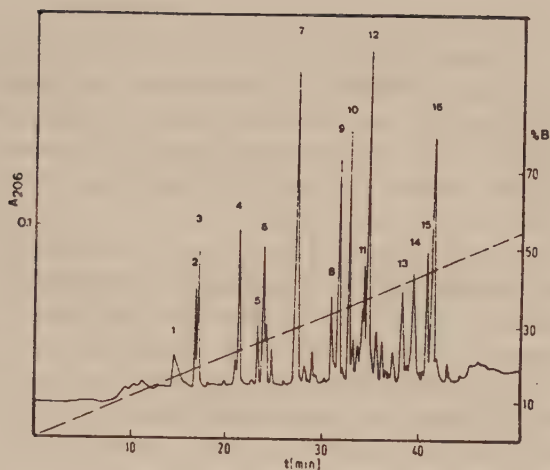


Abb. 37:

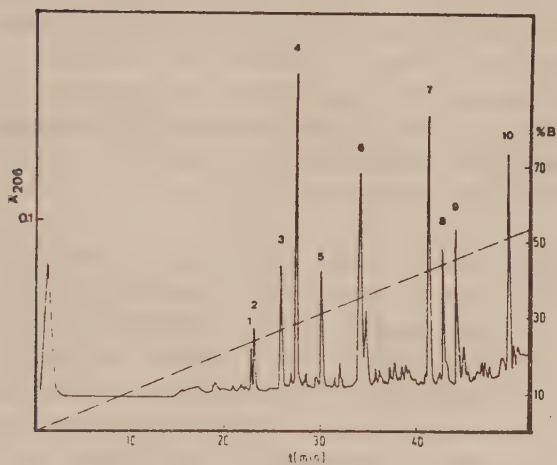


Abb. 38: Auftrennung der tryptischen Spaltgemische der Polypeptide F1-2 (Abb.37) und F3 (Abb.38) durch Reversed Phase-HPLC. Säule: Hibar LiChrospher (12.5 cm x 0.46 cm). Puffer: A, 0.1% TFA in Wasser, B, 0.1% TFA in Acetonitril. Gradient: 0-60% A in (A+B) in 60 min. Durchflußrate: 1.0 ml/min.

Um kleinere Peptide isolieren zu können, wurden Fragment F1-2 und Fragment F3 tryptisch nachgespalten, und das Peptidgemisch über Reversed Phase-HPLC aufgetrennt (Abb. 38 A und B). Auf diese Weise konnten insgesamt 26 Fraktionen isoliert werden (16 aus F1-2 und 10 aus F3).

Ein Aliquot jeder Fraktion wurde N-terminal 3 Schritte nach der Methode von *Chang* ansequenziert (Tabelle 4). 1/30 jedes Peptids wurde zur Aminosäureanalyse nach der OPA-Methode verwendet (Tabelle 4). 1/10 jeder Fraktion wurde getrocknet, mit Borhydrid reduziert und nach *Ellman* (1959) auf den Cysteingehalt hin untersucht (Tabelle 4).

Dabei konnten 7 Fragmente mit einer Disulfidbrücke identifiziert werden. Sie wurden als T(F1-2)7, T(F1-2)9, T(F1-2)13 und T(F1-2)15 bezeichnet, entsprechend den Fraktionen 7, 9, 13 und 15 des HPLC-Musters von Fragment F1-2, und als T(F3)4, T(F3)5 und T(F3)10, entsprechend dem HPLC-Muster von Fragment F3. Ein Fragment, T(F1-2)16, das Fraktion 16 entspricht, enthielt 2 Disulfidbrücken und wurde deshalb mit Thermolysin nachgespalten. Die durch Reversed Phase-HPLC isolierten

Tab. 4: (Tabelle auf Seite 73). Aminosäurezusammensetzung und N-terminale Sequenzen von Peptiden des LMW Kininogens nach Spaltung mit Trypsin und Thermolysin. LMW Kininogen wurde durch limitierte Proteolyse in zwei große Fragmente F1-2 und F3 gespalten und dann durch Trypsin (T) und Thermolysin (TL) nachgespalten. Fraktionen, die disulfidhaltige Peptide (Cys) enthielten, wurden wie in Mat. u. Met. beschrieben identifiziert (+). *, Peptide, die nach Oxidation mit Perameisensäure und Trennung durch HPLC gewonnen wurden.

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Cys	Sequ.
T(F1-2)1	-	-	1.1(1)	0.8(1)	-	-	1.2(1)	-	1.2(1)	-	-	-	-	-	-	-	EV5
T(F1-2)2	-	1.8(2)	-	0.8(1)	-	1.1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8(1)	-	AGA
T(F1-2)3	-	0.8(1)	1.2(1)	1.0(2)	1.3(1)	3.1(3)	-	-	-	-	-	-	-	0.7(1)	0.8(1)	-	EET
T(F1-2)4	-	1.7(2)	1.2(1)	1.0(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AVD
T(F1-2)5	0.7(1)	-	-	-	-	3.3(3)	1.2(1)	-	-	1.0(1)	-	-	-	-	-	-	EGD/TWQ
T(F1-2)6	0.7(1)	-	-	-	-	3.2(3)	1.2(1)	-	-	1.2(1)	-	-	-	-	-	-	EGD
T(F1-2)7-1*	1.9(2)	0.8(1)	1.1(1)	4.1(4)	2.1(2)	-	-	-	-	-	0.7(1)	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)7-2*	0.8(1)	-	1.2(1)	1.8(2)	2.2(2)	-	1.1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)8	0.9(1)	0.9(1)	-	2.0(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)8	2.8(3)	-	3.3(3)	5.6(6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)8-1*	2.7(3)	-	2.2(2)	4.7(5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)9	3.6(4)	-	2.2(2)	0.8(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)10	0.8(1)	-	2.2(2)	2.8(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)11	0.7(1)	1.8(2)	2.3(2)	-	-	1.2(1)	1.1(1)	2.1(2)	-	1.2(1)	1.8(2)	0.9(1)	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)12	2.6(3)	1.8(2)	2.1(2)	1.7(2)	-	1.1(1)	-	-	-	1.1(1)	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)13	2.6(3)	1.8(2)	2.1(2)	1.7(2)	-	1.1(1)	-	-	-	1.2(1)	2.3(2)	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)13-1*	1.7(2)	0.8(1)	2.2(2)	0.8(1)	-	-	-	-	-	1.1(1)	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)13-2*	1.7(2)	0.8(1)	2.2(2)	0.8(1)	-	-	-	-	-	1.1(1)	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)14	3.6(4)	0.9(1)	2.2(2)	2.7(3)	1.2(1)	-	1.1(1)	0.8(1)	1.1(1)	2.2(2)	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)15	6.5(7)	1.7(2)	3.2(3)	2.8(3)	3.2(3)	2.3(2)	-	-	-	2.1(2)	2.1(2)	-	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)15-1*	4.5(6)	1.8(2)	2.1(2)	1.7(2)	2.3(2)	1.1(1)	-	-	-	4.3(4)	2.1(2)	1.7(2)	0.8(1)	1.1(1)	1.8(2)	-	THQ
T(F1-2)15-2*	1.7(2)	-	2.1(2)	0.9(1)	1.1(1)	1.2(1)	-	-	-	2.1(2)	2.2(2)	0.8(1)	-	-	-	-	THQ
T(F1-2)16	1.7(2)	7.5(8)	3.2(3)	6.7(7)	4.3(4)	6.3(8)	5.2(5)	-	-	2.0(2)	2.2(2)	0.8(1)	-	-	-	-	THQ
TL-(F1-2)16-1*	4.6(5)	-	2.7(3)	2.1(1)	4.2(4)	1.1(1)	-	-	-	3.3(3)	3.2(3)	0.7(1)	0.8(1)	1.3(1)	0.7(1)	0.8(1)	THQ
TL-(F1-2)16-1b*	2.6(3)	-	0.8(1)	1.2(1)	3.3(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
TL-(F1-2)16-1b*	1.7(2)	-	1.8(2)	-	-	-	1.2(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)1	1.7(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)4	0.7(1)	3.7(4)	3.2(3)	5.5(6)	-	1.1(1)	1.0(1)	3.3(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)4-1*	-	1.8(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)4-2*	0.8(1)	1.7(2)	2.2(2)	4.7(5)	-	-	-	-	-	1.2(1)	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)6	2.7(3)	0.8(1)	-	0.8(1)	-	1.1(1)	-	-	-	1.1(1)	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)7	1.8(2)	4.7(5)	1.1(1)	2.7(3)	-	2.1(2)	-	-	-	1.2(1)	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)8	0.8(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)9	0.8(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)10	2.6(3)	0.8(1)	2.1(2)	3.7(4)	2.1(2)	1.1(1)	1.1(1)	-	-	1.0(1)	-	-	-	-	-	-	THQ
T(F3)10-1*	1.6(2)	-	1.1(1)	2.6(3)	1.2(1)	1.1(1)	3.3(3)	-	-	1.6(2)	2.1(2)	1.8(2)	-	-	-	-	THQ
T(F3)10-2*	0.8(1)	0.9(1)	1.2(1)	0.8(1)	1.2(1)	-	1.1(1)	1.5(2)	2.2(2)	2.3(2)	0.7(1)	-	-	-	-	-	THQ

Fragmente wurden wie oben beschrieben charakterisiert. Zwei kleine Peptide mit jeweils einer Disulfidbrücke wurden als TL-T(F1-2)16-1 und TL-T(F1-2)16-2 bezeichnet. Alle 9 Fraktionen, die eine einzelne Disulfidbrücke enthielten, wurden rechromatographiert und nochmals N-terminal 3 Schritte im Gasphasensequenzator abgebaut.

Der Halbcysteinrest in Peptid T(F1-2)9 konnte dabei als 1,4 Dithioerythrit-Adduct identifiziert werden. Dies ist möglich, da in den Lösungsmitteln des Gasphasensequenzators 1,4-Dithioerythrit enthalten ist, das während des Abbaus Cystin zu Cystein reduziert, das dann durch β -Elimination konvertiert wird und als Dehydroalanin durch HPLC identifiziert werden kann.

Die N-terminale Sequenzanalyse der cystinhaltigen Fraktionen ergab jeweils 2 parallele Aminosäuresequenzen (Tab. 4). Eine Ausnahme bilden die Fraktionen T(1-2)9, TL-T(F1-2)16-2 und T(F3)5, in denen jeweils nur eine Aminosäuresequenz nachgewiesen werden konnte.

Die 9 Fraktionen mit je einer Disulfidbrücke wurden mit Perameisensäure oxidiert, getrocknet und nochmals im gleichen System chromatographiert. Die oben beschriebenen 6 Fraktionen mit je 2 N-terminalen Sequenzen konnten nach Perameisensäure-Oxidation jeweils in zwei Peptide aufgetrennt werden. Diese Peptide wurden wiederum durch Aminosäureanalyse und N-terminale Sequenzanalyse charakterisiert (Tab. 4).

Auf diese Weise konnten 6 Disulfidbrücken aufgeklärt werden, die Cysteinreste in Position 65 mit 76 (Fragment T(F1-2)7), 89 mit 108 (Fragment T(F1-2)16-1), 188 mit 200 (Fragment T(F1-2)13), 211 mit 230 (Fragment TL-T(F1-2)15), 310 mit 322 (Fragment T(F3)4) und 333 mit 352 (Fragment T(F3)10) verbinden (Fig. 38). Fragment T(F1-2)9, das nur eine N-terminale Sequenz enthielt, konnte nach Oxidation in 2 Peptide aufgetrennt werden, wobei T(F1-2)9-1 durch Aminosäureanalyse als das blockierte N-terminale Peptid der schweren Kette identifiziert werden konnte. Der Halbcystinrest in Position 10 ist dabei mit dem Halbcystin in Position

389 des Peptids T(F1-2)9-2 verbunden. Diese Disulfidbrücke bildet die Verbindung von leichter und schwerer Kette.

Die beiden Peptide TL-T(F1-2)16-2 und T(F3)5, die beide nur einen N-Terminus aufwiesen, konnten auch nach Perameisensäureoxidation nicht in 2 getrennte Peptide aufgespalten werden. Beide enthalten eine interne Disulfidbrücke, die Position 124 mit 127 (TL-T(F1-2)16-2) bzw. Position 246 mit 249 (T(F3)5) verbinden.

Die insgesamt 18 Halbcystinreste bilden somit 9 Disulfidbrücken. 8 davon liegen in der schweren Kette des niedermolekularen Kininogens und bilden aufeinanderfolgende Loops. Die neunte Disulfidbrücke verbindet das im N-terminalen Bereich der schweren Kette liegende Halbcystin in Position 10 mit dem einzigen Halbcystin der leichten Kette in Position 389.

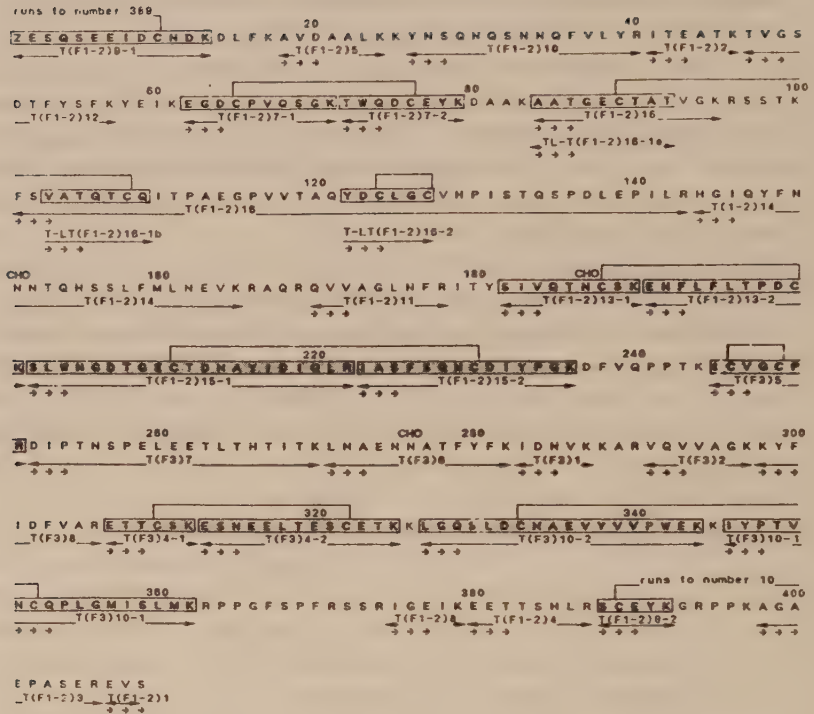


Abb. 39: Anordnung der Disulfidbrücken des menschlichen LMW Kininogens. Die Numerierung entspricht der Reihenfolge der Aminosäuren im Gesamtmolekül. Fragmente, die einen Teil einer Disulfidbrücke bilden, sind schattiert. $\longleftrightarrow$, Länge eines Fragments; $\rightarrow$, durch Edman Abbau identifizierter Aminosäurerest; $\boxed{}$, Disulfidbrücke; die Bezeichnung der Peptide entspricht den Bezeichnungen aus den Chromatographien der Abb. 37/38.

Diskussion

1. Sequenzierungsstrategie

Bei der Sequenzierung von Proteinen der Größenordnung der Kininogene ist es unumgänglich, das Protein zunächst in wenige große Fragmente zu zerlegen, um das Auftrennen der sehr komplexen Peptidgemische von proteolytischen Spaltungen zu erleichtern. Bei den Kininogenen konnte dabei das physiologische Spaltverhalten gegenüber Kallikreinen genutzt werden. So wurden zunächst sowohl hochmolekulares als auch niedermolekulares Kininogen mit Kallikrein limitiert gespalten. Beide Proteine konnten dabei in je 3 Fragmente gespalten werden, die dann als Ausgangsmaterial für weitere Spaltungen dienten. Die N-terminalen Fragmente der Kininogene wurden als schwere Ketten (Molekulargewicht 64 kD) bezeichnet. C-terminal wurde die leichte Kette abgespalten, die beim niedermolekularen Kininogen 4 kD und beim hochmolekularen Kininogen 58 kD (Müller-Esterl et al., 1983) ausmacht. Die Trennung von leichter und schwerer Kette war jeweils erst nach Reduktion möglich. In der Mitte der Kininogene wurde das bei beiden Proteinen identische Kininfragment herausgespalten. Die komplette Aminosäuresequenz wurde von den leichten Ketten des hochmolekularen und des niedermolekularen Kininogens ermittelt. Von den schweren Ketten wurde die Struktur des hochmolekularen Kininogens vollständig aufgeklärt. Die schwere Kette des niedermolekularen Kininogens wurde anhand des tryptischen Spaltmusters durch Ansequenzieren der Peptide und durch Aminosäureanalyse proteinchemisch charakterisiert. Das niedermolekulare Kininogen diente dabei zur Aufklärung der Disulfidbrücken. Der Hauptanteil der Aminosäuresequenzen konnte durch Sequenzierung der Bromcyan-Fragmente und der tryptischen Peptide ermittelt werden. Zur Isolierung von Überlappungspeptiden wurden hauptsächlich Spaltungen mit *Staphylococcus Aureus* V8 Protease und Thermolysin verwendet. Zur Nachspaltung einzelner Fragmente wurden N-Chlorsuccinimid,

N-Bromsuccinimid und Hydroxylamin eingesetzt. Die Aufklärung des C-Terminus erfolgte mit Carboxypeptidase Y. Die N-terminale Pyroglutaminsäure wurde mit Pyroglutamat-amino-peptidase abgespalten.

Die Auftrennung der Spaltpeptide erfolgte durch HPLC auf Reversed Phase- und Gelfiltrations-Säulen. Die Peptide wurden manuell nach der Methode von *Chang (1978)*, im Flüssigphasen- und/oder im Gasphasen-Sequenator sequenziert. Auf diese Weise konnte die gesamte Primärstruktur der Kininogene aufgeklärt werden. Auf die Isolierung des Überlappungspeptids, das die Aminosäuren in Positionen 251 und 252 der schweren Ketten verbindet, wurde verzichtet, da bei Erscheinen der cDNA-Sequenz (*Takagaki et al., 1985*) die bis dahin ermittelte Struktur bestätigt wurde und die verbliebene Lücke anhand der cDNA geschlossen werden konnte. (*Kellermann et al., 1986*).

2. Charakteristika der Primärstruktur des humanen hochmolekularen Kininogens

Hochmolekulares Kininogen ist ein Glycoprotein mit einem in der SDS-Gelelektrophorese apparenten Molekulargewicht von 114 000 D. Auf der Grundlage der proteinchemischen Sequenzdaten besteht das hochmolekulare Kininogen aus 626 Aminosäuren, woraus sich ein Molekulargewicht von 75 334 D errechnet. Berücksichtigt man einen Kohlenhydratanteil von 16 % (*Dittmann et al. 1981*), so ergibt sich ein Gesamtmolekulargewicht von 85 000 D. Diese Werte liegen erheblich unter den publizierten Werten (*Müller-Esterl et al.; 1982*). Bekanntermaßen tendieren jedoch gerade Glycoproteine dazu, hohe Molekulargewichte in der SDS-Gelelektrophorese vorzutäuschen (*Leach et al., 1980*).

Auffallend ist im hochmolekularen Kininogen die Verteilung der Kohlenhydratseitenketten über das gesamte Molekül. Von 12 Kohlenhydratseitenketten, sind 9 O-glycosidisch an Serin oder Threonin gebunden. Alle O-glycosidischen Bindungsstel-

len sind in der leichten Kette lokalisiert. In der schweren Kette hingegen existieren nur 3 Kohlenhydratseitenketten, die allesamt N-glycosidisch an Asparagin gebunden sind. N-glycosidische Bindungen von N-Acetylglucosamin an Asparagin sind stets an die Sequenzfolge -Asn-X-Ser/Thr gekoppelt (Gottschalk et al., 1975). Zwei dieser möglichen Bindungsstellen in Position 30 und 609 sind nicht glycosiliert. Eine mögliche Ursache für das Fehlen einer Kohlenhydratseitenkette liegt im Vorhandensein eines Prolinrestes in der Position X der Codonsequenz (Bause; 1982), wodurch eine Glycosilierung des Asparaginrestes verhindert wird.

Ein Grund für diese unregelmäßige Verteilung der Kohlenhydrate mag in den unterschiedlichen Loci der posttranslationalen Modifizierung der Proteine liegen. So ist bekannt (Tanner et al., 1986), daß die N-glycosidische Bindung unmittelbar nach der Translation noch im endoplasmatischen Retikulum durch Glycosyltransferasen gebildet wird. Die Ausbildung der O-glycosidischen Bindung erfolgt hingegen erst im Golgi-Apparat. Zu diesem Zeitpunkt ist zumindest eine teilweise Faltung des Proteins und eine Ausbildung der Disulfidbrücken bereits erfolgt. Das heißt, im Falle des Kininogens waren nach Glycosilierung der N-glycosidischen Bindungsstellen und Faltung des Proteins nur noch bestimmte Bereiche des Moleküls für eine weitere Glycosilierung zugänglich. Die für Glycosyltransferasen am leichtesten zugänglichen, nach außen gerichteten Epitope, befinden sich demnach im C-terminalen Bereich der leichten Kette und bilden dementsprechend auch Bereiche, die für Kontaktstellen zu anderen Molekülen, wie Faktor XI und Plasmapräkallikrein, am geeignetsten sind.

HMW Kininogen besitzt 9 Disulfidbrücken. 8 davon sind linear angeordnet und bilden 8 Loops in der schweren Kette, während eine den N-terminalen Bereich der schweren Kette mit dem C-terminalen Bereich der leichten Kette verbindet (eine detailliertere Diskussion der Disulfidbrücken erfolgt unter Absatz 9 und 10). Die lineare Anordnung der Disulfidbrücken

läßt die Vermutung zu, daß Kininogene keine sehr kompakten Proteine sind. Diese Vermutung wird durch die Sekundärstrukturvorhersage bestärkt, die nur sehr wenige helikale Bereiche erwarten läßt. Auch weisen eine große Anzahl von β -turns (Abb. 40) auf eine sehr flexible Struktur hin, die es auch ermöglicht, eine große Anzahl verschiedener Epitope, den verschiedenen Funktionen der Kininogene entsprechend, anzubieten. Diese unterschiedlichen Funktionen können durch verschiedene monoklonale Antikörper, die gegen einzelne Epitope gerichtet sind, wahlweise getrennt gehemmt werden (Kaufmann, 1986).

3. Charakteristika der Primärstruktur des niedermolekularen Kininogens

Niedermolekulares Kininogen ist ebenfalls ein Glycoprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von 68 kD in der SDS-Gelelektrophorese. Der Proteinanteil, errechnet aus der Aminosäuresequenz (409 Aminosäuren), entspricht 45 749 D. LMW-Kininogen besitzt jedoch einen weitaus geringeren Kohlenhydratanteil als HMW Kininogen. Die Charakterisierung der schweren Kette des niedermolekularen Kininogens zeigte, daß die Struktur der schweren Ketten beider Kininogene identisch ist. Dieser Befund wurde durch die Sequenzierung der cDNA (Takagaki et al., 1985) beider Kininogene bestätigt. Die leichte Kette hingegen besteht nur aus 38 Aminosäuren und enthält keine Kohlenhydratseitenketten. Das heißt, LMW Kininogen besitzt insgesamt 3 Kohlenhydratseitenketten, die ebenso wie beim HMW Kininogen alle N-glycosidisch an Asparagin gebunden sind. Die Lage der Disulfidbrücken entspricht der Anordnung im HMW Kininogen. Ein Unterschied liegt nur in der Größe des Loops, den N-terminales und C-terminales Halbcystin bilden (getrennte Diskussion der Disulfidbrücken unter Absatz 9 und 10).

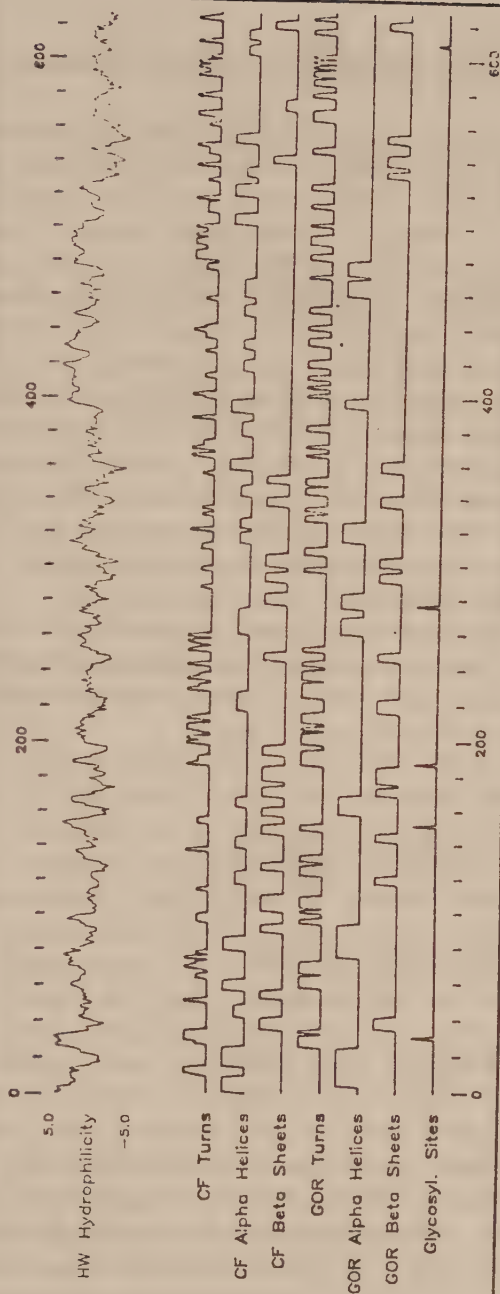


Abb 40: Hydrophilizitäts-Profil und Sekundärstrukturvorhersage für HMW Kininogen. HW, Hydrophilizität nach Hopp und Woods (1981); CF, Vorhersage nach Chou und Fasman (1978); GOR, Vorhersage nach Garnier, Osgothurpe und Robson (1978); Die Skalierung entspricht der Numerierung der Aminosäuren in der Gesamtsequenz. Die Vorhersage der Glycosilierungsstelle am C-terminalen Ende hat geringere Wahrscheinlichkeit, da ein Prolin in der Position X der Codon-Sequenz Asn-X-Ser(Thr) eine Glycosilierung verhindert (Bause, 1982).

4. Interne Homologien der schweren Ketten der Kininogene

Aus der c-DNA Sequenz der bovinen Kininogene (Kitamura et al., 1983 und Nawa et al., 1983) wurden zwei Bereiche mit hoher Homologie abgeleitet, die als IR 1 und IR 2 (internal repeat 1 und internal repeat 2) bezeichnet wurden. Diese Bereiche decken sich nicht mit den Homologien, die durch das Computerprogramm "RELATE" für die humanen Kininogene gefunden wurden. Danach wird die schwere Kette der Kininogene in 3 aufeinanderfolgende Bereiche gegliedert, die sich über die Aminosäuren 1-116, 117-238 und 239-360 erstrecken. Diese Fragmente wurden als A1B1, A2B2 und A3B3 bezeichnet (Abb. 41). Eine quantitative Auswertung dieser Homologie durch das Programm "RELATE" zeigt schwache, aber signifikante Werte für die Paare A1B1/A2B2 (3.89) und A1B1/A3B3 (3.87). Weitaus deutlicher sind diese Werte für die Paarung A2B2/A3B3 (12.27).

Der Befund, daß die schwere Kette des hochmolekularen Kininogens aus drei homologen repetitiven Sequenzabschnitten aufgebaut ist, spiegelt sich auch im Hydrophilizitätsprofil dieser drei Abschnitte wieder (Abb. 42).

Sie unterscheiden sich von der im Rinder-Kininogen gefundenen Homologie dadurch, daß IR 1 Fragment 1 und Fragment 2 von Position 86-207, und IR 2 Fragment 2 und Fragment 3 von Position 208-329 überlappt. Die Unterteilung in einen N-terminalen Bereich A und einen C-terminalen Bereich B wurde vorgenommen, um eine bessere Verfolgung des Evolutionsprozesses zu ermöglichen. Da die Sequenzbereiche B1 und B2 bzw. A2 und A3 den höchsten Grad an Homologie aufweisen, scheint die Annahme wahrscheinlich, daß die schwere Kette nicht durch eine einfache Gentrifikation entstanden ist, sondern durch eine Duplikation des Bereichs AB, dem eine nochmalige Duplikation des Bereichs BA folgte (Abb. 43). Diese Annahme wird dadurch bestätigt, daß die Bereiche A1B1, A2B2 und A3B3 nur in 19.5-29.6 % der Positionen identische Aminosäuren aufweisen, die Bereiche B1A2 und B2A3 aber in 33.7 % der Aminosäuren übereinstimmen.

```

A1 - - - - - ZESQSEETDCNDKDLFKAVDAALK
A2 VVTAQYDCLGCVHPLSTQSPDLLEPIIRHGQ
A3 VQPPTKICVCCPRDIPTHSEELLEETITHTT

A1 KYNSQNCNNQFVLYRITEATKTVGSDTFS
A2 YFNNNTQHSSLTLMNEVKRAQROVVAGLNFR
A3 KLNAEENATFYFKIDNVKKARVOVYAKKKF

A1 FKYETKEGDCPVQSGK-TWQDCRYDAAKAA
A2 ITYSIVQTNCSKENFLFLTPDCKSLWNID--
A3 IDFVARETTCSKESNEELTESCTTKKLQ--

B1 TGECTATVGRSSTKFSVATGTCTTAEGP
B2 TGECTDNAVIDIQLRIASFSGNDYLGKDF
B3 SLDCNKENYVVPWEKKIYPLVCCPLGMISL

```

Abb. 41: Die schwere Kette des humanen hochmolekularen Kininogens wurde in 6 aufeinanderfolgende Segmente zerlegt in der Reihenfolge A1B1-A2B2-A3B3. Zur Verbesserung der Homologien wurden Insertionen eingeführt. Identische Aminosäuren der A- bzw. B-Fragmente sind unterlegt.

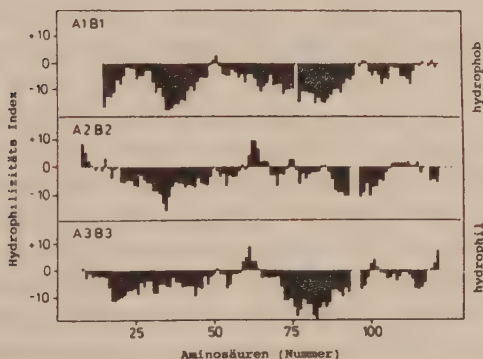


Abb. 42: Hydrophilizitätsprofil der schweren Kette der Kininogene. Die Anordnung entspricht der in Abb. 41 gemachten Untergliederung. Die Berechnung erfolgte nach Kyte and Doolittle (1982).

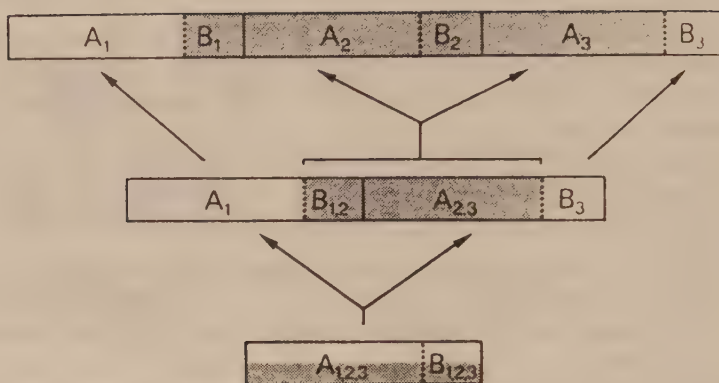


Abb. 43: Evolutionsmodell der schweren Kette der Kininogene.

5. Interne Homologien der leichten Kette des hochmolekularen Kininogens.

Beim Vergleich verschiedener Bereiche der leichten Kette des hochmolekularen Kininogens konnten 3 aufeinanderfolgende homologe Fragmente gefunden werden, die sich von Position 402-491 erstrecken (Abb. 44). Diese 3 Fragmente, die aus jeweils 30 Aminosäuren aufgebaut sind, bilden das gesamte "Histidin-reiche Fragment". So scheint dieser, für die Kontaktphasenaktivierung wichtige Bereich des Kininogenmoleküls durch Gentrifikation entstanden zu sein.

Jedes Segment A der schweren Kette wird von 2 Exons, nicht wie ursprünglich angenommen von einem, codiert. Abbildung 45 stellt ein Evolutionsmodell des Genoms des Kininogens dar, das basierend auf Homologievergleichen zeigt, daß sich schwere und leichte Kette unabhängig voneinander entwickelt haben könnten.

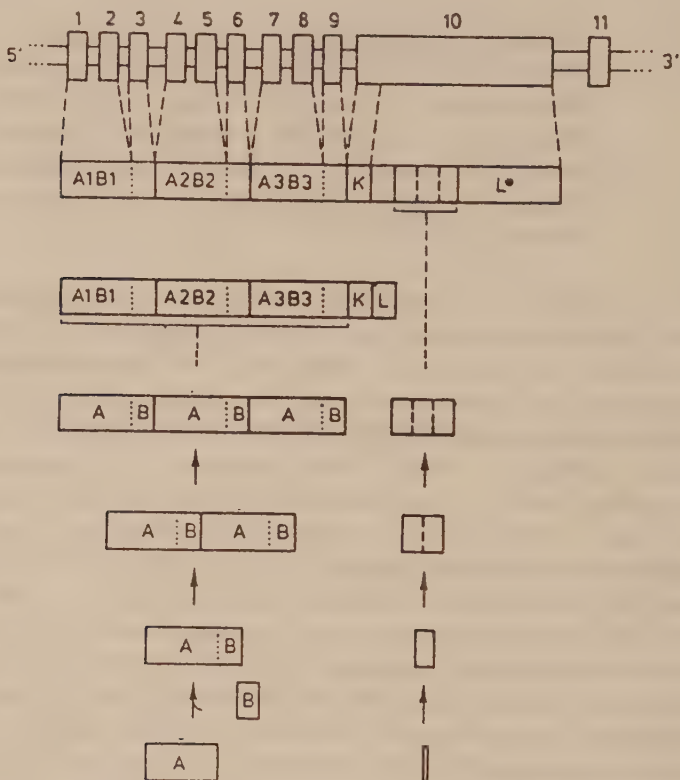


Abb. 45: Modell der genomischen Organisation von HMW und LMW Kininogen mit dem Evolutionsmodell der entsprechenden Genprodukte. L, leichte Kette; K, Kinin

6. Vergleich von bovinem und humanem hochmolekularem Kininogen

Ein Vergleich des humanen hochmolekularen Kininogens mit der entsprechenden Sequenz des Rindes (*Iwanaga et al.*, 1983) zeigt eine äusserst ausgeprägte Homologie über das gesamte Molekül (67 % der Aminosäuren sind identisch). Interessant erscheint eine Insertion von 22 Aminosäuren (Position 458-479), die sich in einem äusserst konservierten Teil der Sequenz im Bereich des "Histidin-reichen Fragments" des humanen Moleküls befindet (Abb. 46).

QESQSE EIDCNDKDL FKA VDAAL KKYNSQNKQSHNQFVLYRITEATKT VGS
QES-SQEIDCNDQDVFKA VDAALT KYNSENKSGNQFVLYRITEVARMONP

DTFYSLFKYEIKEGDCPVQS GKTWQDC EYKDAKKAATGECTATVGRSS TK
DTFYSLKYQIKEGDCPFQSNKTYWQCDYKDSAGKAATGECTTPAEGPVVTA

FSVA TQTCQITPAEGPVVTAQYECLGCVHPISTKSPDLEPI LRHG IQYFN
ATVAKRGNMKSFAVIAQTCLIQYECLGCVHPISTKSPDLEPI LRVA IQYFN

CHO
NNTQHS S LFM LHEVKKAAQRQVVA GLNFRITVYSIAVQTNCSKENFLFLTPDC
NNTSHSLFLDLKEVKKAAQRQVVS GWNHYEVNYSIAVQTNCSKEEFSFLTPDC

KDLWN GDTGECTD NAYIDIQLR IASFSQNC DIYPG KDFVQPPTKICVGC P
KSLSS GDTGECTD KAHV D V K L R I S S F S Q K C D L Y P V K D F V Q P P T R L C A G C P

RDIPTNHSPELEETLTHTITKLNAEHNATFYFKIDNVKGA RVQV VAGGRYF
KPIPVDSPLLEELLSHSIAKLNAEHDGAFYFKIDTVKKA RVQV VAGLKY S

IDFVARET TCSKE SNEELTKSCE TTKL GQS LDCN A E VYVVPWEKKIYPTV
IVFIAREE TCSKG SNEELTKSCE INIH GQILHCDAN VYVVPWEKKVYPTV

NCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEE TTTVS PPHTSMA PAVQDEERO
NCQPLGQT SLMKRPPGFSPFRSSVQVMKTEGSS TTTVSLPHSAMSPVQDEERO

SGKEQGHTRRH D W G H E K Q R K L H N L G H G H K H E R D Q G H G H Q R G H G L G H G H E Q
SGKEQGP THGHGW DHGKQIKLHLHGLGLGHKKH KHDQGHGHGHS HGLGHGHGK

QHGLGHGHKFKLDDDL EHQGGHVLDHGHKH KHGHGHGKHKHKKGNKGNH
QHGLGHGH-----KHGHGHGKHKHKKGNKGNH

GWKTEH LASS S EDSTTSSAQTGEKTE GTPIP SLAK PGVTV TFS DFQDS D
DWRTPY LASSY EDSTTSSAQTGEKTE ETTLSSLAQ PGVAITFP DFQDS D

LIATWMPPI SPAPIQ SDDDWIPDIQTDPNGLS FNPISDFPD TTS PKCPGR
LIATVMPNTLP PPHTE SDDDWIPDIQTDPNGLS LAFKLI SDFPE TTS PKCPSR

PWKSVSEINPTTGMKESYYFDLT DGLS
PWKPVNGVNPTVEMKESHDFDLVDA L L

Diese Insertion, gemeinsam mit einem Aminosäureaustausch in Position 131, bei dem ein Arginin des Rinder-Kininogens durch ein Lysin ersetzt ist, bietet eine Erklärung für das unterschiedliche Gerinnungsverhalten der beiden Kininogene. Die molekularen Vorgänge bei der proteolytischen Prozessierung von hochmolekularem Kininogen durch Plasmakallikrein sind am Beispiel des Rindes eingehend untersucht (*Iwanaga et al., 1979*). Aus bovinem HMW Kininogen wird durch Kallikrein zunächst Kinin freigesetzt (Abb. 47). Sekundär wird das gesamte "Histidin-reiche Fragment" in Form des Fragments F 1.2 herausgespalten, was eine Inaktivierung des Kininogens zur Folge hat (*Sugo et al., 1980*). Das restliche Molekül ist nicht mehr zur Bindung an subendotheliale Oberflächen befähigt und dissoziiert von der Oberfläche ab. Eine derartige Inaktivierung wird im humanen System nicht beobachtet (*Scott et al., 1984*). Die limitierte Proteolyse mit Plasmakallikrein, und die anschließende Charakterisierung und Sequenzierung der entstandenen Fragmente zeigte, daß es auch beim Menschen zunächst zur Abspaltung des Kininfragments kommt (*Müller-Esterl et al., 1985*). Sekundär wird ein Teil des Histidin-reichen Fragments herausgespalten (68 Aminosäuren), was dem bovinen Fragment F 1 entspricht. Die verbleibende Reststruktur des Histidin-reichen Peptids reicht jedoch zur Bindung an die Oberfläche aus. Tertiär kommt es beim Menschen zur Abspaltung eines C-terminalen Fragments von 24 Aminosäuren (F2). Dieses unterschiedliche Verhalten im Gerinnungsprozess ist auf die Insertion und den Aminosäureaustausch in Position 502 zurückzuführen.

Abb.46: (Abbildung auf Seite 87) Homologievergleich von menschlichem (obere Zeile) und bovinem hochmolekularem Kininogen. Identische Aminosäuren in entsprechenden Positionen sind umrandet.

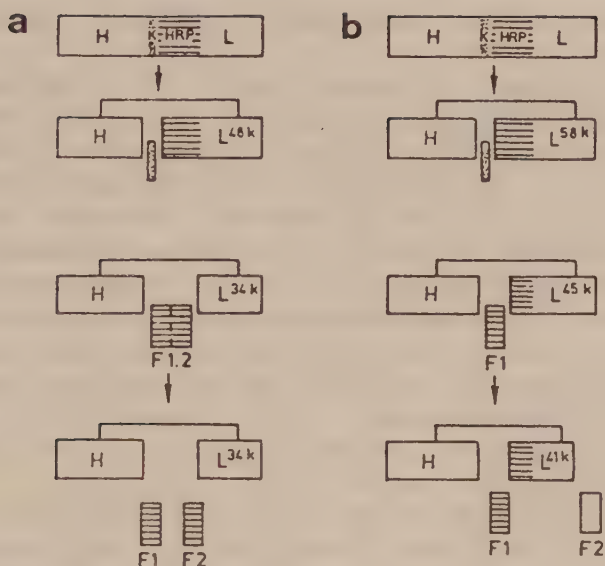


Abb. 47: Schema der proteolytischen Prozessierung von bovinem (a) und humanem (b) hochmolekularem Kininogen durch Plasmakallikrein. H, schwere Kette; L, leichte Kette; K, Kinin; HRP, Histidin-reiches Peptid;

7. Homologie mit anderen Proteinen

Während der Sequenzierung eines Proteins ist man normalerweise ständig bemüht, bereits Teilsequenzen in Hinblick auf Homologien zu anderen Proteinen zu untersuchen. Ein derartiger Vergleich führte auf die Spur einer neuen Funktion der Kininogene. Der Vergleich eines Peptides mit der Sequenz eines Peptides aus einem Cysteinproteinase-Inhibitor, das im Institut von Prof. Machleidt sequenziert wurde, zeigte vollkommene Identität beider Peptide. Daraufhin wurden Sequenzvergleiche mit allen bisher

sequenzierten Cysteinproteinase-Inhibitoren durchgeführt (Abb. 48).

Auf Grund ihrer Primärstruktur können diese niedermolekularen Cysteinproteinase-Inhibitoren in zwei Familien unterteilt werden: die "Stefine" mit einer relativ schwachen Homologie zu den A-Bereichen der Kininogene und die "Cystatine" mit einer ausgeprägten Homologie zu den AB-Fragmenten. Die Homologie der Stefine beschränkt sich dabei auf das A-Fragment rund um das vermutliche aktive Zentrum der Cysteinproteinase-Inhibitoren (Gln-Val-Val-Ala--Gly). Bei den Cystatinen ist diese Homologie auch auf das B-Fragment erweitert. Errechnet man den Grad der Homologie mit dem Computerprogramm "RELATE" (Abb. 49), so ist zumindest einer der 3 "AB-repeats" homolog zu jedem Cysteinproteinase-Inhibitor (außer TPI).

Die Strukturaufklärung der Kininogene läßt somit eine Erweiterung der Klassifizierung dieser Inhibitorensuperfamilie zu. So kommen nun zu den Stefinen und Cystatinen noch die Kininogene hinzu.

Abb. 48: (Abbildung auf Seite 91). Homologievergleich aller bisher sequenzierten Cysteinproteinase-Inhibitoren. hu kin D1,D2,D3, interne Homologien der schweren Kette der Kininogene; hu cys, Cystatin aus humanem Plasma (*Brzin et al., 1984 und Grubb et al., 1982*); hu SAP, acidic protein aus menschlicher saliva (*Isemura et al., 1984*); bo CPI, Cystein Proteinase Inhibitor aus bovinem Colostum (*Hirado et al., 1985*); ch cys, Cystatin aus Hühnereiweiß (*Turk et al., 1983 und Schwabe et al., 1984*). Insertionen wurden zur Verbesserung der Homologie eingeführt. Identische Aminosäuren in entsprechenden Positionen von Kininogenen und anderen Inhibitoren sind unterlegt und umrandet.

hu kin D1	1	-----ZESQSE	E	I	D	C	N	D	K	D	L	F	K	A	V	D	A																
hu kin D2	113	AEGPVVTAQYDC	L	G	C	V	H	P	I	S	T	Q	S	P	D	L	E	P	I	L	R	H											
hu kin D3	235	GKDFVQPPTK	I	C	V	G	C	P	R	D	I	P	T	N	S	P	E	L	E	E	T	L	T	H									
hu cys	1	---SSPGKPPRL	V	G	G	P	M	D	A	S	V	E	E	E	G	V	R	R	A	L	D	F											
hu SAP	1	-----I	I	P	G	G	I	Y	D	A	D	L	N	D	E	W	V	Q	R	A	L	H	F										
bo CPI	1	-----RL	L	G	G	L	M	E	A	D	V	N	E	E	G	V	Q	E	A	L	S	F											
ch cys	1	-----SEDRSRL	L	G	A	P	V	P	V	D	E	N	D	E	G	L	Q	R	A	L	Q	F											
hu kin D1	22	A	L	K	K	Y	N	S	Q	N	Q	S	N	N	Q	F	V	L	Y	R	I	T	E	A	T	K	T	V	G	S	D	T	F
hu kin D2	145	G	I	Q	Y	F	N	N	N	T	Q	H	S	S	L	F	M	L	N	E	V	K	R	A	Q	R	Q	V	V	A	G	L	N
hu kin D3	267	T	I	T	K	L	N	A	E	N	N	A	T	F	Y	F	K	I	D	N	V	K	K	A	R	V	Q	V	V	A	G	K	K
hu cys	30	A	V	G	E	Y	N	K	A	S	N	D	N	Y	H	S	R	A	L	Q	V	V	R	A	R	K	Q	I	V	A	G	V	N
hu SAP	23	A	I	S	E	Y	N	K	A	T	E	D	E	Y	Y	R	R	P	L	Q	V	L	R	A	R	E	O	T	F	G	G	V	N
bo CPI	23	A	V	S	E	F	N	K	R	S	N	D	A	Y	Q	S	R	V	V	R	V	V	R	A	R	K	Q	V	V	S	G	M	N
ch cys	28	A	M	A	E	Y	N	R	A	S	N	D	K	Y	S	S	R	V	V	R	V	I	S	A	K	R	Q	L	V	S	G	I	K
hu kin D1	54	Y	S	F	K	Y	E	I	K	E	G	D	C	P	V	-	Q	S	G	K	T	W	Q	D	C	E	Y	K	D	A	A	-	K
hu kin D2	177	F	R	I	T	Y	S	I	V	Q	T	N	C	S	K	E	N	F	L	F	L	T	P	D	C	K	S	L	W	N	G	-	-
hu kin D3	299	Y	F	I	D	F	V	A	R	E	T	T	C	S	K	E	S	N	E	E	L	T	E	S	C	E	T	K	K	L	G	-	-
hu cys	62	Y	F	L	D	V	E	L	G	R	T	T	C	T	K	-	-	T	Q	P	N	L	D	N	C	P	F	H	D	Q	P	H	L
hu SAP	55	Y	F	F	D	V	E	V	G	R	T	I	C	T	K	-	-	S	Q	P	N	L	D	T	C	A	F	H	E	Q	P	E	L
bo CPI	55	Y	F	L	D	V	E	L	G	R	T	T	C	T	K	-	-	S	Q	A	N	L	D	S	C	P	F	H	N	Q	P	H	L
ch cys	60	Y	I	L	Q	V	E	I	G	R	T	T	C	P	K	-	-	S	S	G	D	L	Q	S	C	E	F	H	D	E	P	E	M
hu kin D1	84	A	A	T	G	E	C	T	A	T	V	G	K	R	S	S	T	K	F	S	V	A	T	Q	T	-	C	Q	I	T	P		
hu kin D2	207	-	D	T	G	E	C	T	D	N	A	Y	I	D	I	Q	L	R	I	A	S	F	S	Q	N	-	C	D	I	Y	P		
hu kin D3	329	-	Q	S	L	D	C	N	A	E	V	Y	V	V	P	W	E	K	K	I	Y	P	T	V	N	-	C	Q	P	L	G		
hu cys	92	K	R	K	A	F	C	S	F	Q	I	Y	A	V	P	S	Q	G	T	M	T	L	S	K	S	T	C	Q	D	A	-		
hu SAP	85	Q	K	K	Q	L	C	S	F	E	I	Y	E	V	P	N	E	D	R	M	S	L	V	D	S	R	C	Q	E	A	-		
bo CPI	85	K	R	E	K	L	C	S	F	Q	V	Y	V	V	P	N	M	N	T	I	N	L	V	K	F	S	C	Q	D	-	-		
ch cys	90	A	K	Y	T	T	C	T	F	V	V	Y	S	I	P	W	L	N	Q	I	K	L	L	E	S	K	C	Q	-	-	-		

	hu ste	hu CPI B	ra ep TPI	ra li TPI	hu cys	hu SAP	bo CPI	hu cys	$\bar{x}$
A1B1	0.39	2.64	1.96	3.14	1.56	0.70	3.15	4.89	2.30
A2B2	1.38	1.04	0.83	2.52	4.32	1.52	5.14	5.02	2.72
A3B3	6.01	3.19	1.80	4.00	6.26	8.37	10.25	5.99	5.73

Abb. 49: Sequenzhomologien der homologen Bereiche A1B1, A2B2 und A3B3 mit den Cysteinproteinase-Inhibitoren des Stefin- und Cystatin-Typs. Statistisch signifikante Homologien, die sich in einem SD-Wert >3 widerspiegeln, sind unterlegt. Abkürzungen wie in Abb. 48 ausser: ra ep TPI (Takio et al., 1984), Thiolproteinase-Inhibitor aus Rattenepidermis (Cystatin α); ra li TPI (Takio et al., 1983), Thiolproteinase-Inhibitor aus Rattenleber (Cystatin β); hu CPI B, Cysteinproteinase-Inhibitor B aus humaner Leber (Ritonja et al., 1985); hu ste, Stefin aus menschlichen Granulocyten (Machleidt et al., 1983)

8. Modell zur Evolution der Cysteinproteinase-Inhibitoren

Auf der Basis dieser Homologievergleiche kann ein Modell zur Evolution der Cysteinproteinase-Inhibitoren vorgeschlagen werden (Abb. 50). So scheint der Urtyp dieser Superfamilie ein Protein des "Stefin"-Typs zu sein, das nur aus einem A-Element besteht. Vermutlich durch Genfusion wurde ein B-Element addiert, was zur Familie der Cystatine führte. Eine Genduplikation führte dann zu einem bisher nicht bekannten Intermediat aus zwei AB-Elementen, aus dem dann durch eine weitere Genduplikation die schwere Kette der

Kininogene entstand. Es kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß sich Cystatine und Stefine divergent aus einem gemeinsamen Vorläufer AB entwickelt haben, wobei die Stefine eine B-Einheit verloren haben. Eine konvergente Evolution dieser beiden Cysteinproteinase-Inhibitoren kann ebenfalls nicht gänzlich ausgeschlossen werden, erscheint jedoch nach den vorliegenden Daten eher unwahrscheinlich.

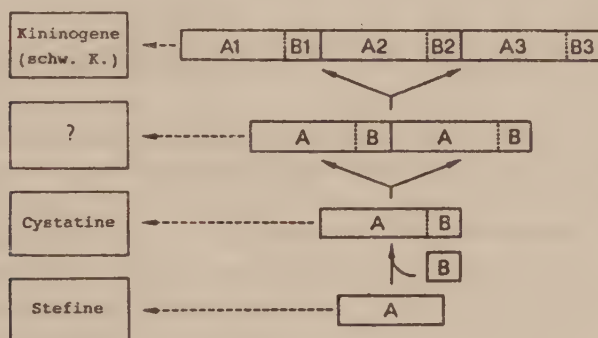


Abb. 50: Modell zur Evolution von Cysteinproteinase-Inhibitoren; (?), postulierte Intermediat.

Diese dreifach interne Homologie der Kininogene läßt die Annahme zu, daß pro Molekül Kininogen 3 Cysteinproteinasen gebunden werden können. Es enthalten jedoch nur A2B2 und A3B3 das potentielle aktive Zentrum. Salvesen (*Salvesen et al. 1987*) konnte kürzlich nach limitierter Proteolyse der schweren Kette der Kininogene drei getrennte AB-Fragmente isolieren, von denen wirklich nur A2B2 und A3B3 inhibitorische Wirkung zeigten.

Mit diesen Erkenntnissen konnte erstmals der schweren Kette eine eigene physiologische Funktion zugeordnet werden. Damit dürften die Kininogene neben α_2 -Macroglobulin die wichtigsten Cysteinproteinase-Inhibitoren im Plasma sein.

Unklar ist jedoch immer noch die Funktion plasmatischer Cysteinproteinase-Inhibitoren, da bislang keine Cysteinproteinasen plasmatischer Herkunft bekannt sind (Barret et al., 1980). Vermutlich spielen die Kininogene jedoch eine Rolle bei der Hemmung von Cysteinproteinasen lysosomalen Ursprungs, die durch Exocytose oder aus Phagocyten ins Plasma gelangen. Damit dürften Kininogene eine ähnliche Schutzfunktion wie α_1 -Antitrypsin (Travis et al., 1983) wahrnehmen und eine unspezifische Proteolyse von Plasma-proteinen durch Enzyme lysosomalen Ursprungs verhindern.

9. Charakteristiken der Disulfidbrücken der Kininogene

Die 9 Disulfidbrücken des niedermolekularen Kininogens können entsprechend der Größe des Loops, den sie bilden, in 4 Gruppen unterteilt werden. Typ A bildet einen Loop von 12-13 Aminosäuren, Typ B überbrückt 20 Aminosäuren, Typ C 4 Aminosäuren und Typ D bildet einen Loop von 380 Aminosäuren. Typ A und Typ B liegen im niedermolekularen Kininogen in je drei Kopien vor (Abb. 51), Typ C in zwei Kopien und Typ D in einer Kopie. Jede dieser Klassen zeichnet sich durch hohe Sequenzhomologien der einzelnen Kopien untereinander aus. Dies entspricht der Tatsache, daß die schwere Kette der Kininogene aus drei repetitiven Domänen aufgebaut ist, von denen jede zwei oder drei Loops enthält. Die Disulfidbrücken sind dabei tandemartig so angeordnet, daß die drei A- und B-Loops jeweils von einem C-Loop unterbrochen werden (A-B-C-A-B-C-A-B). Die lineare Orientierung der Disulfidbrücken wird von den beiden Halbcystinresten flankiert, die durch den einzigen Loop des D-Typs schwere und leichte Kette miteinander verbinden (Abb. 52).

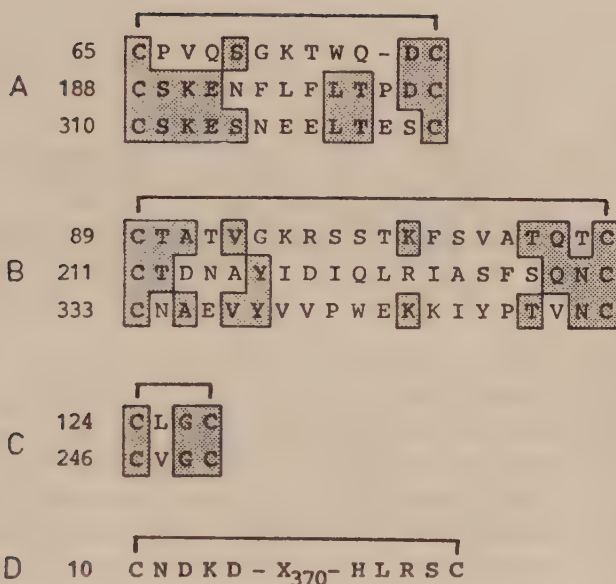


Abb. 51: Humanes LMW Kininogen zeichnet sich durch 4 Typen von Disulfidbrücken aus. Typ A überbrückt 12-13 Aminosäuren (3 Kopien), Typ B 20 Aminosäuren (3 Kopien), Typ C 4 Aminosäuren (2 Kopien) und Typ D bildet einen Loop von 380 Aminosäuren. Die Numerierung entspricht den Positionen der Aminosäuren im Gesamtmolekül. Identische Aminosäuren in entsprechenden Positionen sind durch Schattierung und Umrandung gekennzeichnet.

Da die Aminosäuresequenzen der schweren Ketten des nieder- und des hochmolekularen Kininogens identisch sind, und die leichten Ketten beider Kininogene jeweils nur ein Cystein beinhalten, kann davon ausgegangen werden, daß auch die Anordnung der Disulfidbrücken identisch ist, ausgenommen die Brücke des D Typs, die 587 Reste (statt 380 im nieder-molekularen Kininogen) überspannt.

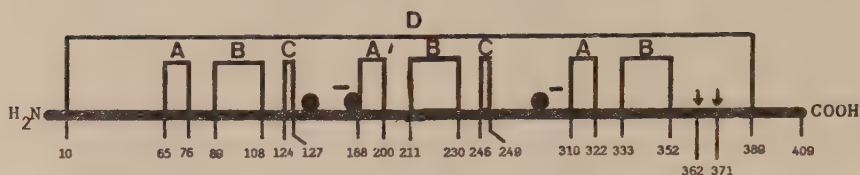


Abb. 52: Schematische Anordnung der Disulfidbrücken im niedermolekularen Kininogen. A, B, C und D bezeichnen die 4 verschiedenen Typen von Disulfidbrücken entsprechend Abbildung 51. Die Numerierung entspricht den Positionen der Aminosäuren im Gesamtmolekül. ●, Kohlenhydratbindungsstellen. ↓, Spaltstelle für Kallikrein. ➡, Position des aktiven Zentrums Q-V-V-A-G.

10. Vergleich der Disulfidbrücken der 3 Familien von Cysteinproteinase-Inhibitoren.

Stefine, die im Evolutionsmodell als die ursprünglichste Familie der Cysteinproteinase-Inhibitoren postuliert wurden, besitzen keinerlei Disulfidbrücken, während die Cystatine 2 Loops von 11 bzw. 21 Aminosäuren aufweisen (Barrett et al., 1986). Ein Vergleich der Typ A- und Typ B-Loops der Kininogene mit den entsprechenden Regionen der Cystatine zeigt, daß gerade dieser Bereich der Proteine äusserst konserviert ist (Fig. 53).

Genduplikationen eines Cystatingens entstanden sind, wobei in der Gegend der Berührungspunkte der Domänen ein Loop des C-Typs eingefügt wurde. Da A- und B-Loops in beiden Inhibitorfamilien konserviert sind, scheinen diese beiden Disulfidbrücken für die Funktion des Proteins als Inhibitor essentiell zu sein. Dies wird dadurch bekräftigt, daß durch selektive Reduktion des D-Loops am kininfreien Kininogen (Higashima et al., 1986) die Inhibitorfunktion nicht beeinträchtigt wird, während durch eine Reduktion des Gesamt moleküls das Protein gänzlich inaktiviert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Grubb et al. (1984) überein, die Cystatin durch Reduktion vollkommen inaktivieren konnten. Die Inhibitorkonstanten der Kininogene (Müller-Esterl et al., 1985) und der isolierten Domänen des niedermolekularen Kininogens (Salvesen et al., 1986) sowie die der Cystatine (Barrett et al., 1984 und Gounaris et al., 1984) weisen darauf hin, daß auch das Fehlen des C Loops die inhibitorische Funktion nicht beeinflußt. Diese Folgerung wird durch Versuche bestätigt (Müller-Esterl et al., unveröffentlicht), die zeigen, daß Domäne 3 allein, in welcher der C-Loop fehlt, Cysteinproteinasen immer noch mit hoher Affinität zu hemmen vermag.

11. Strukturelle Organisation der Kininogene

Ansichts der beschriebenen funktionellen Vielfältigkeit der Kininogene taucht die Frage nach der strukturellen Organisation dieser Proteine auf. Eine Zusammenfassung der gegenwärtig bekannten Funktionen und eine Zuordnung auf einzelne Bereiche des Moleküls ist in Abbildung 54 dargestellt. HMW Kininogen besitzt in seiner schweren Kette 2 inhibitorisch aktive Zentren (DH II und DH III), an die sich C-terminal das Kinin-Fragment (DH IV) anschließt. In der leichten Kette liegt das histidinreiche Peptid (DH V), das für die Kontaktphasenaktivierung in der Blutgerinnungskaskade eine entscheidende Rolle spielt. C-terminal davon

liegt der Bereich, der für die Bindung von Plasmaprokalikrein und/oder Faktor XI verantwortlich ist (DH VI). Dieser Abschnitt beinhaltet auch eine Anhäufung von Kohlenhydratseitenketten. Eine Funktion der N-terminalen Region (DH I) ist bislang unbekannt. Somit besitzt hochmolekulares Kininogen 6 "Domänen", von denen zumindest 5 definierte Funktionen wahrnehmen. Das niedermolekulare Kininogen besitzt dagegen nur 5 Domänen, von denen 4 funktionsgleich mit den entsprechenden Domänen (DH I-IV) des HMW Kininogens sind. Über die Funktion der leichten Kette (DL V) des LMW Kininogens ist bislang nichts bekannt.

Die Kininogene sind die ersten Inhibitoren, die neben der Proteinase-Hemmung noch andere Funktionen wahrnehmen. Sie sind damit multifunktionelle Proteine, die so unterschiedliche Aufgaben wie Proteinase-Hemmung, Kinin-Bereitstellung, Kontaktphasenaktivierung und Enzym-Komplexierung erfüllen.

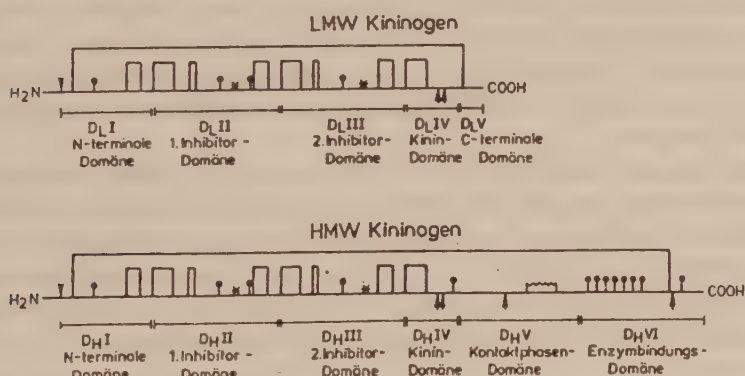


Abb. 54: Domänenstruktur menschlicher Kininogene. D_L I-V, Domänen des LMW Kininogens; D_H I-VI, Domänen des HMW Kininogens; ♢, Kohlenhydratseitenkette; *, reaktives Hemmzentrum; †, Spaltstelle für Kallikreine; ~~, Extension im humanen HMW Kininogen; □, Disulfidbrücke.

AUSBLICK

Aufgrund der erarbeiteten Erkenntnisse über die Struktur und Funktion der Kininogene ergeben sich neue Ansatzpunkte, um noch mehr Information über das Zusammenwirken der einzelnen Gerinnungsfaktoren zu gewinnen.

Interessant wäre vor allem die Lokalisation der Bindungsdomäne für Plasmakallikrein, da unter Umständen durch geeignete synthetische Peptide, die der Struktur der Bindungsdomäne entsprechen, das Andocken von Plasmakallikrein an Kininogen verhindert werden könnte. Dadurch wäre es zum ersten Mal möglich, die intrinsische Gerinnungskaskade unabhängig vom extrinsischen Gerinnungsweg zu inhibieren, was zum Beispiel während Operationen mit extrakorporaler Zirkulation von großem Interesse wäre.

Ein weiteres großes Ziel wäre die Untersuchung der Regulation der Kininwirkung. Dazu wäre es vor allem notwendig, den Rezeptor für Kinin zu isolieren, dessen Struktur aufzuklären und etwaige Prozessierungen (Internalisation, Phosphorylierung, Recycling usw.) zu untersuchen.

All diese Untersuchungen sollten zu einem tieferen Verständnis der Wirkungsmechanismen des Kallikrein-Kinin-Kininase Systems unter physiologischen und pathologischen Bedingungen beitragen. Zu diesem Effektor System ist im weiteren Sinn sicher auch der Rezeptor-Komplex zu rechnen, der unter Umständen selbst eine Kininase darstellt.

Zusammenfassung

Kininogene sind einkettige Glycoproteine, die in der Leber synthetisiert und ins Plasma abgegeben werden. Aus dem menschlichen Plasma konnten bisher zwei Arten von Kininogenen isoliert werden, das hochmolekulare (HMW, high molecular weight kininogen) und das niedermolekulare Kininogen (LMW, low molecular weight kininogen). Sie unterscheiden sich in ihrer Molekülgröße und in ihrer Spaltbarkeit durch Kallikreine. Die Kininogene sind Vorläufer-Moleküle von vasoaktiven Oligopeptiden, den Kininen. Das hochmolekulare Kininogen fungiert ausserdem als Assemblierungsfaktor bei der Kontaktphasenaktivierung der Blutgerinnungskaskade.

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Primärstruktur beider menschlicher Kininogene aufzuklären und Unterschiede und Gemeinsamkeiten beider Proteine zu finden.

1. Sequenzierungsstrategie

Die humanen Kininogene wurden ihrem physiologischen Spaltmuster entsprechend mit Kallikrein in eine leichte Kette, eine schwere Kette und ein Kininfragment gespalten. Diese Bruchstücke dienten als Ausgangsmaterial zur weiteren Sequenzierung. Der Hauptanteil der Aminosäuresequenzen konnte über Peptide ermittelt werden, die nach Spaltung mit Bromcyan oder Trypsin isoliert worden waren. Zur Isolierung von Überlappungspeptiden wurden Spaltungen mit *Staphylococcus Aureus* Protease V8 und Thermolysin verwendet. Zur Nachspaltung einzelner Fragmente wurde N-Chlorsuccinimid, N-Bromsuccinimid und Hydroxylamin eingesetzt. Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Die Peptide wurden nach der Methode von Pehr Edman sequenziert.

2. Die Struktur des menschlichen hochmolekularen Kininogens

Das humane hochmolekulare Kininogen ist ein einkettiges Glycoprotein mit einem in der SDS Gelelektrophorese ermittelten Molekulargewicht von 114 000 D. Es besteht aus 626 Aminosäuren (75 343 D), von denen 362 die schwere Kette (Position 1-362), 9 das Kininfragment (Position 363-371) und 225 die leichte Kette (Position 372-626) bilden. Das HMW Kininogen besitzt 18 Halbcystinreste, von denen 17 in der schweren Kette liegen und einer in der leichten Kette (Position 596) lokalisiert ist. Dieser bildet einen Teil der Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette. Die restlichen 16 Halbcystinreste bilden in der schweren Kette 8 aufeinanderfolgende Disulfidbrücken.

Das hochmolekulare Kininogen besitzt 12 Kohlenhydratseitenketten. Auffallend ist dabei die ungleichmäßige Verteilung der N- und O-glycosidisch gebundenen Zucker. Alle drei N-glycosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten sind in der schweren Kette lokalisiert, die 9 O-glycosidisch gebundenen Kohlenhydrate liegen in der leichten Kette.

3. Die Struktur des humanen niedermolekularen Kininogens

Das menschliche LMW Kininogen zeigt in der SDS Gelelektrophorese ein Molekulargewicht von 68 000 D. Es ist aus 409 Aminosäuren aufgebaut. Bei limitierter Proteolyse durch Kallikrein entstehen auch hier drei Fragmente. Eine schwere Kette mit einem Molekulargewicht von 62 000 D, das Kininfragment (1000 D) und eine leichte Kette mit einem Molekulargewicht von 5 000 D. Die Primärstruktur der schweren Kette ist identisch mit der Primärstruktur der schweren Kette des HMW Kininogens. In Position 18 der leichten Kette liegt der Halbcystinrest, der einen Teil der Disulfidbrücke zur schweren Kette bildet. Die leichte Kette enthält keine Kohlenhydratseitenketten.

4. Vergleich von humanem LMW- und HMW-Kininogen

Ein Vergleich beider humaner Kininogene zeigt vollkommene Identität beider Moleküle in der schweren Kette und darüber hinaus bis zur Position 383. Die leichte Kette (M_r 63 kD) des hochmolekularen Kininogens ist um 217 Aminosäuren länger als die leichte Kette (M_r 5 kD) des niedermolekularen Kininogens.

5. Vergleich von humanem und bovinem HMW-Kininogen

Ein Vergleich von humanem HMW Kininogen mit dem entsprechenden Kininogen des Rindes zeigt Identität in 67% aller Aminosäuren. Auffallend ist eine Insertion von 22 Aminosäuren in der leichten Kette des hochmolekularen Kininogens des Menschen. Diese Einfügung liegt in einem funktionell wichtigen Bereich des Moleküls, dem Histidinreichen Fragment, einer Region, die durch ihre Ladung dazu geeignet ist, das gesamte Kininogenmolekül an negativ geladene Oberflächen zu binden. C-terminal von diesem Fragment (Position 502) befindet sich im bovinen Molekül ein Argininrest, dessen Bindung durch Plasmakallikrein gespalten wird. Das restliche Kininogen mit schwerer und leichter Kette löst sich anschließend von der Oberfläche ab. Die negativen Oberflächen bleiben dabei durch das Histidinreiche Fragment besetzt, und die Gerinnungsaktivität geht verloren. Beim humanen Molekül ist dieses Arginin durch einen Lysinrest ersetzt. Dieser Austausch, zusammen mit der Insertion, verhindert eine Abspaltung des Histidinreichen Fragments, sodaß die Gerinnungsaktivität erhalten bleibt. Diese strukturellen Unterschiede beider Moleküle liefern eine Erklärung für die unterschiedliche Spaltbarkeit und somit für das unterschiedliche Gerinnungsverhalten von bovinem und humanem hochmolekularen Kininogen.

6. Homologie zu anderen Proteinen

Signifikante Homologien wiesen die schweren Ketten der humanen Kininogene zu Cysteinproteinase-Inhibitoren (Stefine und Cathepsine) auf. Hemmversuche mit Cathepsin L, einer Cysteinproteinase aus humaner Leber, bestätigten die aus den Strukturdaten gewonnenen Vermutungen daß Kininogene selbst Cysteinproteinase-Inhibitoren sind.

Hiermit konnte den Kininogenen eine neue Funktion als Inhibitoren zugeordnet werden.

7. Evolution von Cysteinproteinase-Inhibitoren

Aus Computervergleichen der Aminosäuresequenzen aller bisher bekannten Cysteinproteinase-Inhibitoren konnte ein Modell zur Evolution dieser Proteine entwickelt werden. Es schlägt vor, daß sich die Cysteinproteinase-Inhibitoren aus zwei ursprünglichen Elementen A und B entwickelt haben. Die Stefine, die aus einer einzigen A Einheit bestehen, stellen dabei den ursprünglichsten Typ dar. Die Genfusion einer A und einer B Einheit führte zum Typ der Cystatine. Zwei weitere Genduplikationen führten schließlich zum $(AB)_3$ Typ, der von den Kininogenen repräsentiert wird.

8. Kininogene als multifunktionelle Proteine

Kininogene sind aus 5 bzw. 6 Domänen aufgebaut. Sie dienen der Proteinase-Hemmung, Kinin-Bereitstellung, Kontaktphasenaktivierung und der Enzymkomplexierung.

LITERATURVERZEICHNIS

- Barlas, A., H.Okamoto, and L. M.Greenbaum: T-Kininogen - the Major Plasma Kininogen in Rat Adjuvant Arthritis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 280-286 (1985).
- Barret, A., and J.K.McDonald: Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography. 1980.
- Barrett, A. J., H.Fritz, A.Grubb, S.Isemura, M.Järwinen, N.Katunuma, W.Machleidt, W.Müller-Esterl, M.Sasaki, and V.Turk: Nomenclature and Classification of the Proteins Homologous with the Cysteine-Proteinase Inhibitor Chicken Cystatin. Biochem. J. 236, 312-312 (1986).
- Barrett, A. J., M.E.Davies, and A.Grubb: The Place of Human α -Trace (Cystatin C) amongst the Cysteine Proteinase Inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 631-636 (1984).
- Bause, E.: Structural Requirements of N-glycosylation of Proteins. Biochem. J. 209, 331-336 (1982).
- Borges, D. R., and A. H.Gordon: Kininogen and Kininogenase by the Liver of Normal and Injured Rats. J. Pharm. Pharmacol. 28, 44-48 (1976).
- Bornstein, P.: Structure of α_1 -CB8, a Large Cyanogen Bromide Produced Fragment from the α_1 Chain of Rat Collagen. The Nature of a Hydroxylamine-Sensitive Bond and Composition of Tryptic Peptides. Biochemistry 9, 2408-2421 (1970).
- Brandt, W. F., P.Edman, A.Henschen, and C.Holt von: Abnormal Behaviour of Proline in the Isothiocyanate Degradation. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1505-1508 (1975).

Brauer, A. W., C. L.Oman, and M. N.Margolies: Use of o-Phthalaldehyde to Reduce Background during Automated Edman Degradation. *Anal. Biochem.* 137, 134-142 (1984).

Brzin, J., T.Popovic, V.Turk, U.Borchart, and W.Machleidt: Human Cystatin, a New Protein Inhibitor of Cystein Proteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 103-109 (1984).

Capra, J. D., C. E.Wilde III, and D. G.Klapper: Comparison of Solid-Phase and Spinning Cup Sequencing Methodologies II: The Use of Polybrene for the Automated Sequence Analysis of Small Peptides with a Forty Minute DMAA Program in the Spinning Cup Sequencer. (in: *Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis*. eds.: Previero, A. & Colletti-Previero, Elsevier, North Holland), 69-80 (1977).

Chang, J. Y., D.Brauer, and B.Wittmann-Liebold: Micro-Sequence Analysis of Peptides and Proteins using 4-NN-Dimethylaminoazobenzene 4-Isothiocyanate/Phenylisocyanate Double Coupling Method. *FEBS Lett.* 93, 205-214 (1978).

Chou, P. Y., and G. D.Fasman: Prediction of the Secondary Structure of Proteins from their Amino Acid Sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 45-148 (1978).

Cole, T., A.S.Inglis, C. M.Roxburgh, G. J.Howlett, and G.Schreiber: Major Acute Phase α_1 -Protein of the Rat is Homologous to Bovine Kininogen and Contains the Sequence for Bradykinin: its Synthesis is Regulated at the mRNA Level. *FEBS Lett.* 182, 57-60 (1985).

Crestfield, A.M., S.Moore, and W.H.Stein: The Preparation and Enzymatic Hydrolysis of Reduced and S-carboxymethylated Proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622-627 (1963).

Davie, E. W., K.Fujikawa, K.Kurachi, and W.Kisiel: The Role of Serine Proteases in Blood Coagulation. Adv. Enzymol. 48, 277-318 (1979).

Davie, E.W., and K.Fujikawa: Basic Mechanisms in Blood Coagulation. Ann. Rev. Biochem. 44, 799-829 (1975).

Dayhoff, M. O., L. T.Hunt, W. C.Barker, B. C.Orcutt, Yeh, L. S, H. R.Chen, D. G.George, M. C.Blomquist, G.Johnson, and C: Atlas of Protein Sequence and Structure. Natl. Biomed. Res. Found., Georgetown Univ. Med. Center Washington, DC. Vol. 5, (1982).

Dittmann, B., A.Steger, R.Wimmer, and H.Fritz: A Convenient Large-Scale Preparation of High Molecular Weight Kininogen from Human Plasma. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 919-927 (1981).

Dixon, H. B. F., and R. N.Perham: Reversible Blocking of Aminogroups with Citraconic Anhydride. Biochemistry 109, 312-314 (1968).

Drapeau, G. R.: Cleavage of Glutamic Acid with Staphylococcal Protease. In: Methods in Enzymology (Hirs, C. H. W., und Thimasheff, S. N., eds.). N. Y. Academic Press XLVII, 189-191 (1977).

Edman, P., and G.Begq: A Protein Sequenator. Eur. J. Biochem. 1, 80-91 (1967).

Edman, P., and A.Henschen: Sequence Determination. in: Protein Sequence Determination , 232-279 (1975).

Ellman, G. L.: Tissue Sulfhydryl Groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77 (1959).

Erdoes, E. G.: Inhibitors of Kininases. Fed. Proc. 38, 2774-2777 (1979).

Esnard, F., and F.Gauthier: Rat α 1-Cysteine Proteinase Inhibitor. J. Biol. Chem. 258, 12443-12447 (1983).

Frey, E. K., H.Kraut, E.Wehrle, R.Vogel, G.Zickgraf, and I.Trautschold: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. Enke Verlag, Stuttgart 1968.

de Freitas, F. M., E. Z.Faraco, and D. F.de Azevedo: General Circulatory Alterations Induced by i. v. Infusion of Bradykinin in Man. Circulation 29, 66-70 (1964).

George, D. G., B. C.Orcutt, M. O.Dayhoff, and W. C.Barker: NBR Report 820502-08710 Program Version 1.0, Natl. Biomed. Res. Found., Georgetown Univ. Med. Center, Washington, DC. (1982).

Gilles, A.-M., A.Lecroisey, and B.Keil: Primary Structure of α -Clostripain Light Chain. Eur. J. Biochem. 145, 469-476 (1984).

Gottschalk, A.: Glycoproteins : Their Composition, Structure and Function. Elsevier, Amsterdam (1975).

Gounaris, A. D., M. A.Brown, and A. J.Barrett: Human Plasma α -Cysteine Proteinase Inhibitor. Biochem. J. 221, 445-452 (1984).

van der Graf, F., J. A.Koedam, and B. N.Bouma: Inactivation of Kallikrein in Human Plasma. J. Clin. Invest. 71, 149-158 (1983).

Griffin, J. H., and C. G.Cochrane: Mechanism for the Involvement of HMW Kininogen in Surface-Dependant Reactions of Hageman Factor. Proc. Natl. Acad. Sci USA 73, 2554-2558 (1976).

Gross, E., and B.Wittkop: Selective Cleavage of the Methionyl Peptide Bond in Ribonuclease with Cyanogen Bromide. J. Amer. Chem. Soc. 83, 1510-1510 (1961).

Grubb, A., H.Löfberg, and A. J.Barrett: The Disulfide Bridges of Human Cystatin C (q-Trace) and Chicken Cystatin. FEBS Lett. 170, 370-374 (1984).

Han, R., H.Kato, S.Iwanaga, and T.Suzuki: Primary Structure of Bovine Plasma High-Molecular-Weight Kininogen: The Amino Acid Sequence of a Glycopeptide Portion (Fragment 1) Following the C-Terminus of the Bradykinin Moiety. J. Biochem. 79, 1201-1222 (1976).

Han, Y. N., M.Komiya, S.Iwanaga, and T.Suzuki: Studies on the Primary Structure of Bovine HMW Kininogen. Amino Acid Sequence of a Fragment ("Histidine-Rich Peptide") Released by Plasma Kallikrein. J. Biochem. 77, 55-68 (1975).

Hayashi, R.: Carboxypeptidase Y in Sequence Determination of Peptides. Meth. Enzymol. 47, 84-93 (1977).

Hayashi, R., S.Moore, and W. H.Stein: Carboxypeptidase from Yeast. J. Biol. Chem. 248, 296-2302 (1973).

Heimark, R. L., K.Kurachi, K.Fujikawa, and E. W.Davie: Surface Activation of Blood Coagulation, Fibrinolysis and Kinin Formation. Nature 286, 456-460 (1980).

Heinrikson, R. L.: Applications of Thermolysin in Protein Structural Analysis. Methods Enzymol. 47, 175-189 (1977).

Henschen, A., F.Lottspeich, V.Brantl, and H.Teschemacher: Novel Opioid Peptides Derived from Casein (β -Casomorphins) II. Structure of Active Components from Bovine Casein Peptone. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1217-1224 (1979).

Henschen, A.: Disulfide Bridges in the Middle Part of Human Fibrinogen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1757-1770 (1978).

Henschen, A., F.Lottspeich, T.Sekita, and R.Warbinek: Amino Acid Sequence of Human Fibrinogen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 605-605 (1976).

Henschen-Edman, A., and F.Lottspeich: Aspects on Automated and Microscale Sequencing. in: Methods in Peptide and Protein Sequencing Analysis , 105-113 (1980).

Hermodson, M. A., L. H.Ericsson, K.Titani, H.Neurath, and K. A.Walsh: Application of Sequenator Analyses to the Study of Proteins. Biochemistry 11, 4493-4502 (1972).

Higashiyama, S., I.Ohkubo, H.Ishiguro, M.Kunimatsu, K.Sawaki, and M.Sasaki: Human High Molecular Weight Kininogen as a Thiol Proteinase Inhibitor: Presence of the Entire Inhibition Capacity in the Native Form of Heavy Chain. Biochemistry 25, 1669-1675 (1986).

Hirado, M., S.Tsunasawa, F.Sakiyama, M.Niinobe, and S.Fujii: Complete Amino Acid Sequence of Bovine Colostrum Low-M_r Cysteine Proteinase Inhibitor. FEBS Lett. 186, 41-45 (1985).

Holzer, H., and P. C.Heinrich: Control of Proteolysis. Ann. Rev. Biochem. 49, 63-91 (1980).

Hopp, T. P., and K. R.Woods: Prediction OF Protein Antigenic

- Determinants from Amino Acid Sequences. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3824-3828 (1981).
- Houmard, J., and G. R.Drapeau: Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamyl Bonds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3506-3509 (1972).
- Hunkapiller, M. W., and L. E.Hood: Protein Sequence Analysis: Automated Microsequencing. Science 219, 650-659 (1982).
- Isemura, S., E.Saitoh, and K.Sanada: Isolation and Amino Acid Sequence of Sap-1, an Acidic Protein of Human Whole Saliva, and Sequence Homology with Human q-Trace. J. Biochem. 96, 489-498 (1984).
- Iwanaga, S., H.Kato, T.Sugo, N.Ikari, N.Hashimomto, and S.Fujii: The Kallikrein-Kinin System: A Functional Role of Plasma Kallikrein and Kininogen in Blood Coagulation. In: Biological Functions of Proteinases, A. Springer, Berlin 1979, 243-259.
- Jacobsen, S.: Separation of Two Different Substrates for Plasma Kininforming Enzymes. Nature 210, 98-99 (1966).
- Johnson, A. R.: Effects of Kinins on Organ Systems. In: Loc. Cit. 32, 357-400 (1979).
- Kato, H., S.Nagasawa, and S.Iwanaga: HMW and LMW Kininogens. Methods. Enzymol. 80, 172-198 (1981).
- Kato, R., S.Nagasawa, and T.Suzuki: Studies on the Structure of Bovine Kininogen: Cleavages of Disulfide Bonds and of Methionyl Bonds in Kininogen-II. J. Biochem. 67, 313-323 (1970).

Kaufmann, W.: Herstellung monoklonaler Antikörper gegen menschliche Kininogene. Ludwig Maximilians Universität, München; Diplomarbeit 1987.

Kellermann, J., F.Lottspeich, A.Henschen, and Müller-Esterl: Completion of the Primary Structure of Human High Molecular Kininogen. The Amino Acid Sequence of the Entire Heavy Chain and Evidence for its Evolution by Gene Triplication. Eur. J. Biochem. 154, 471-478 (1986).

Kellermann, J., C.Thelen, F.Lottspeich, A.Henschen, Vogel, R., and W.Müller-Esterl: Arrangement of the Disulfide Bridges in Human Low-M Kininogen. Biochem. J. 247, 15-21 (1987).

Kerbiriou, D. M., and J. H.Griffin: Human HMW Kininogen. Studies of the Structure-Function Relationships and of Proteolysis of the Molecule Occuring During Contact Activation of Plasma. J. Biol. Chem. 254, 12020-12027 (1979).

Kitamura, N., H.Kitagawa, D.Fukushima, Y.Takagaki, T.Miyata, and S.Nakanishi: Structural Organization of the Human Kininogen Gene and a Model for its Evolution. J. Biol. Chem. 260, 8610-8617 (1985).

Kitamura, R., Y.Takagaki, S.Furuto, T.Tanaka, H.Nawa, and S.Nakanishi: A Single Gene for Bovine High and Low Molekular Weight Kininogens. Nature 305, 545-548 (1983).

Kraut, H., E. K.Frey, and E.Werle: Über die Inaktivierung des Kallikreins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 192, 1-27 (1930).

Kyte, J., and R.F.Doolittle: A simple Method for Displaying the Hydropathic Character of Protein. J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982).

Laemmli, V. K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. Nature 227, 680-680 (1970).

Leach, B. S., J. F.Colman, and W. W.Fish: Behaviour of Glycopolypeptides with Empirical Molecular Weight Estimation Methods. Biochemistry 19, 5734-5741 (1980).

Levitt, M. Y.: A Simplified Representation of Protein Conformations for Rapid Stimulation of Protein Folding. J. Mol. Biol. 104, 59-107 (1976).

Lischwe, M. A., and M. T.Sung: Use of N-Chlorosuccinimide/Urea for the Selective Cleavage of Tryptophanyl Peptide Bonds in Proteins. J. Biol. Chem. 252 (14), 4976-4980 (1977).

Lottspeich, F.: Identification of Phenylthiohydantoin Derivatives of Amino Acids by High Pressure Liquid Chromatography Using a Ternary Isocratic Solvent System. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1829-1834 (1980).

Lottspeich, F., J.Kellermann, A.Henschen, G.Rauth, and W.Müller-Esterl: Human Low Molecular Mass Kininogen. Amino Acid Sequence of the Light Chain; Homology with other Protein Sequences. Eur. J. Biochem. 142, 227-232 (1984).

Lottspeich, F., J.Kellermann, A.Henschen, B.Foertsch, and W.Müller-Esterl: The Amino Acid Sequence of the Light Chain of Human High Molecular Mass Kininogen. Eur. J. Biochem. 152, 307-314 (1985).

Lottspeich, F.: Microscale Isocratic Separation of Phenylthiodantoin Amino Acid Derivates. J. Chromatogr. 326, 321-327 (1985).

- Lottspeich, F.: Microscale Isocratic Separation of Phenylthiohydantoin Amino Acid Derivatives. J. Chromatogr. 326, 321-327 (1985).
- Machleidt, W., U.Borchardt, H.Fritz, J.Brzn, A.Ritonja, and V.Turk: Primary Structure of Stefin, a Cytosolic Protein Inhibitor of Cysteine Proteinases from Human Polymorphonuclear Granulocytes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1481-1486 (1983).
- Moore, S.: On the Determination of Cystine as Cysteic Acid. J. Biol. Chem. 238, 235-237 (1963).
- Mort, A. J., and D. T. A.Lamport: Anhydrous Hydrogen Fluoride Deglycosylates Glycoproteins. Anal. Biochem. 82, 289-309 (1977).
- Müller-Esterl, W., G.Rauth, H.Fritz, F.Lottspeich, and A.Henschen: Human Kininogens. In: Kininogenases / Kallikrein, F.K. Schattauer, Stuttgart-New York 1983,1-28.
- Müller-Esterl, W., H.Fritz, J.Kellermann, Lottspeich, F, W.Machleidt, and V.Turk: Genealogy of Mammalian Cysteine Proteinase Inhibitors. FEBS Lett. 191, 221-226 (1985).
- Müller-Esterl, W., H.Fritz, W.Machleidt, A.Ritonja, J.Brzn, V.Turk, J.Kellermann, and F.Lottspeich: Human Plasma Kininogens are Identical with α -Cysteine Proteinase Inhibitors. Evidence from Immunological, Enzymological and Sequence Data. FEBS Lett. 182, 310-314 (1985).
- Müller-Esterl, W., G.Rauth, J.Kellermann, F.Lottspeich, and A.Henschen: Limited Proteolysis of Human Low Molecular Mass Kininogen. Isolation and Characterization of the Heavy and the Light Chain. Eur. J. Biochem. 149, 15-22 (1985).

Müller-Esterl, W., H.Hock, G.Rauth, J.Kellermann, F.Lottspeich, and A.Henschen: Limited Proteolysis of HMW Kininogen by Plasma Kallikrein in Man. Evidence for a Processing Mechanism Different from the Bovine System. Adv. Exp. Med. Biol. 198A, 97-103 (1986).

Müller-Esterl, W., M.Vohle-Timmermann, B.Boos, and B.Dittmann: Purification and Properties of Human Low Molecular Weight Kininogens. Biochim. Biophys. Acta. 706, 145-152 (1982).

Müller-Esterl, W., and H.Fritz: Human Kininogens and their Function in the Kallikrein-Kinin System. Adv. Exp. Med. Biol. 167, 41-62 (1984).

Nakahara, M.: Binding and Dissociation of Hageman Factor, Prekallikrein and HMW Kininogen in Human Plasma during Contact Phase Activation. Biochem. Pharmacol. 29, 1247-1254 (1980).

Nasjletti, A., and K.Malik: The Renal Kallikrein-Kinin and Prostaglandin Systems Interaction. Ann. Rev. Physiol. 43, 597-609 (1981).

Nawa, H., N.Kitamura, T.Hirose, M.Asai, S.Inayama, and S.Nakanishi: Primary Structures of Bovine Liver LMW Kininogen Precursors and their two mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90-94 (1983).

Neurath, H., and K. A.Walsh: Role of Proteolytic Enzymes in Biological Regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3825-3832 (1976).

Nishikawa, K.: Assessment of Secondary-Structure Prediction of Proteins Comparison Computerized Chou-Fasman Method with Others. Biochem. Biophys. Acta 748, 285-299 (1983).

Ogura, K., M.Maeda, M.Nagai, T.Tanaka, K.Nomoto, and T.Murachi: Purification and Structure of a Novel Cysteine Proteinase Inhibitor, Strepin P-1. Agric. Biol. Chem. 49, 799-805 (1985).

Ohkubo, I., K.Kurachi, T.Takasawa, H.Shiokawa, and M.Sasaki: Isolation of a Human cDNA for α_2 -Thiol Proteinase Inhibitor and its Identity with Low Molecular Weight Kininogen. Biochemistry 23, 5691-5697 (1984).

Orcutt, B. C., M. O.Dayhoff, and U. C.Barker: NBR Report 820503-08710, Programm Version 1,0, Document. Natl. Biomed. Res. Found. Georgetown Univ. Med. Center, Washington, DC. May, (1982).

Podell, D. N., and G. N.Abraham: A Technique for the Removal of Pyroglutamic Acid from the Amino Terminus of Proteins Using Calf Liver Pyroglutamate Amino Peptidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 176-185 (1978).

Ramachandran, L. K. and Witkop, B.: N-Bromsuccinimide Cleavage of Peptides. Meth. Enzymol. 11, 283-289 (1967).

Ratnoff, O. D.: The Biology and Pathology of the Initial Stages of Blood Coagulation. Prog. Hematol. 5, 204-209, (1966).

Regoli, D., and J.& Barabe: Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins. Pharmacol. Rev. 32, 1-46 (1980).

Ritonja, A., W.Machleidt, and A. J.Barrett: Amino Acid Sequence of the Intracellular Cysteine Proteinase Inhibitor Cystatin B from Human Liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 131, 1187-1192 (1985).

Robson, B., and D. J.Osquthorpe: Refined Models for Computer Stimulation of Protein-Folding. J. Mol. Biol. 132, 19-51 (1979).

Rocha e Silva, M., W. T.Beraldo, and G.Rosenfeld:
Bradykinin, a Hypotensive and Smooth Muscle Stimulating
Factor Released from Plasma Globulin by Snake Venom and by
Trypsin. Am. J. Physiol. 156, 261-273 (1949).

Salvesen, G., C.Parkes, M.Abrahamson, A.Grubb, ABarrett, and J:
Human Low-M_r Kininogen Contains Three Copies of a
Cystatin Sequence that are Divergent in Structure and in
Inhibitory Activity for Cysteine Proteinases. Biochem. J.
234, 429-434 (1986).

Schill, W.B., G.Preissler, B.Dittmann, and W.Müller-Esterl:
Effect of Pancreatic Kallikrein, Sperm Acrosin and HMW
Kininogen on Cervical Mucus Penetration Ability of Seminal
Plasma-free Human Spermatozoa. Adv. Exp. Med. Biol. 120,
305-310 (1979).

Schneider, H.-J., R.Drexel, G.Feldmaier, B.Linzen, F.Lottspeich, and A.Henschen: Hemocyanins in Spiders,
XVIII. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1357-1381
(1983).

Schwabe, C., A.Anastasi, H.Crow, J. K.McDonald, and A. J.Barrett: Cystatin. Biochem. J. 217, 813-817 (1984).

Scott, C. F., L. D.Silver, M.Schapira, and R. W.Colman:
Cleavage of Human High Molecular Weight Kininogen
Markedly. J. Clin. Invest. 73, 954-962 (1984).

Shechter, Y., A.Patchornik, and Y.Burstein: Selective
Chemical Cleavage of Tryptophanyl Peptide Bonds by
Oxidative Chlorination with N-Chlorosuccinimide.
Biochemistry 15 (23), 5071-5075 (1976).

Sueyoshi, T., K.Enjyoji, T.Shimada, H.Kato, S.Iwanaga, Y.Bando, E.Kominami, and N.Katunuma: A New Function of
Kininogens as Thiol-Proteinase Inhibitors: Inhibition of

Papain and Cathepsins B, H and L by Bovine, Rat and Human Plasma Kininogens. *FEBS Lett.* 182, 193-195 (1985).

Sueyoshi, T., T.Miyata, N. Kato, H.Hashimoto, and S.Iwanaga: The Complete Amino Acid Sequence of Bovine HMW Kininogen. in: *Kinins IV, Part A*, (Greenbaum, L.M., Margolius, H.S., eds) Plenum Publishing Corporation, 26-33 (1986).

Sugo, T., N.Ikari, H.Kato, S.Iwanaga, and S.Fujii: Functional Sites Of Bovine HMW Kininogen as a Cofactor in Kaolin -Mediated Activation of Factor XII (Hageman Factor). *Biochemistry* 19, 3215-3220 (1980).

Sugo, T., H.Kato, S.Iwanaga, and S.Fujii: The Accelerating effect of Bovine Plasma HMW Kininogen on the Surface-Mediated Activation of Factor XII: Generation of a Derivative form (Active Kininogen) with maximal Cofactor Activity by Limited Proteolysis. *Thromb. Res.* 24, 329-337 (1981).

Takagaki, Y., N.Kitamura, and S.Nakanishi: Cloning and Sequence Analysis of cDNAs for Human High Molecular Weight and Low Molecular Weight Prekininogens. *J. Biol. Chem.* 260, 8601-8609 (1985).

Takeda, A., H.Kajii, K.Nakaya, Y.Aoki, Nakamura, Y, and T.Samejima: Amino Acid Sequence of Derivates of Newborn Rat Epidermal Thiol Proteinase Inhibitor. *Biochem. Intern.* 11, 557-564 (1985).

Takio, K., E.Kominami, Y.Bando, N.Katunuma, and K.Titani: Amino Acid Sequence of Rat Epidermal Thiol Proteinase Inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 149-154 (1984).

Takio, K., E.Kominami, N.Wakamatsu, N.Katunuma, and K.Titani: Amino Acid Sequence of Rat Liver Thiol Proteinase Inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115,

902-908 (1983).

Tanner, W.: Glycoproteine: Struktur, Biosynthese, Funktion. Ber. Deutsc. Bot. Ges. 99, 237-249 (1986).

Thompson, R. E., R. Jr.Mandle, and A. P.Kaplan: Studies of Binding of Prekallikrein and Factor XI to HMW Kininogen and its Light Chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4862-4866 (1979).

Travis, J., and G. S.Salvesen: Human Plasma Proteinase Inhibitors. Ann. Rev. Biochem. 52, 655-709 (1983).

Tschesche, H., and T.Dietl: The Amino Acid Sequence of Isoinhibitor K from Snails (*Helix pomatia*). A Sequence Determination by Automated Edman Degradation and Mass-Spectral Identification of the Phenylthiohydantoins. Eur. J. Biochem. 58, 439-451 (1975).

Tsugita, A., T.Uchida, H.W.Mewes, and T.Ataka: A Rapid Vapour-Phase Acid (Hydrochloric Acid and Trifluoroacetic Acid) Hydrolysis of Peptide and Protein. J. Biochem. 102, 1593-1597 (1987).

Turk, V., J.Brzin, M.Longer, A.Ritonja, and M.Epokin: Amino Acid Sequence of Cystatin from Chicken Egg White. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1487-1496 (1983).

Unterberg, A., and A.Baethman: The Kallikrein-Kinin-System as Mediator in Brain Edema: Part 1. Cerebral Exposure to Bradykinin and Plasma. J. Neurosurg. 61, 87-96 (1984).

Urban, J., D.Chanq, and G.Schreiber: A Rat Serum Glycoprotein whose Synthesis Rate Increases Greatly during Inflammation. J. Biol. Chem. 254, 10565-10568 (1979).

- Vogel, R., I.Trautschold, and E.Werle: Natürliche Proteinase-Inhibitoren. Thieme Verlag: Stuttgart 1966.
- Webster, M. E.: Hypothensive Peptides. In: E. G. Erdoes, N. Back, F. Sicuteri, Springer Verlag, New York , 648-648 (1966).
- Werle, E., R.Kehl, and K.Koebke: Über Trypsin, Chymotrypsin, Kallidin und Bradykinin. Biochem. Z. 321, 213-220 (1950).
- Werle, E.: Die Wirkung des Kallikreins (Padutin) auf den isolierten Darm. Klin. Wschr. 15, 848-849 (1936).
- Werle, E., and U.Berek: Zur Kenntnis des Kallikreins. Angew.Chem. 60, 53-53 (1948).
- Werle, E., W.Goetze, and A.Keppler: Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. Biochem. Z. 289 1937.
- Wickl Mayer, M., G.Dietze, L.Mayer, T.Boettger, and J.Grunst: Evidence for an Involvement of Kinin Liberation in the Priming Acting of Insulin on Glucose uptake into Skeletal Muscle. FEBS Lett. 98, 61-65 (1979).
- Wiman, B., and D.Collen: Molecular Mechanism of Physiological Fibrinolysis. Nature 272, 549-550 (1978).

LEBENS LAUF

Vor-u.Familienname: Josef Herbert Kellermann

Geburtstag: 19. Mai 1953

Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Josef Kellermann und
Helga Kellermann, geb. Herzog

1959 - 1963 Besuch der Volksschule in Rohrbach

1963 - 1973 Besuch des Gabelsberger Gymnasiums in
Mainburg

Mai 1973 Abitur

1973 - 1975 Ableistung des Wehrdienstes

November 1975 Aufnahme des Studiums der Biologie an
der Ludwig-Maximilians-Universität in
München

1982 Diplomarbeit im Fach Zoologie unter
Anleitung von Herrn Prof. Dr. LINZEN
mit dem Thema: "Über das Vorkommen von
Kohlenhydraten in der Kette a des
Hämocyanins der Vogelspinne
Eurypelma Californicum".

1983 Beginn der Promotionsarbeit am
Max-Planck- Institut für Biochemie in
Martinsried unter Anleitung von Dr.
LOTTSPREICH in der Arbeitsgruppe von Frau
Dr. HENSCHEN mit dem Thema: "Die Primär-
struktur der menschlichen Kininogene".

1987 Verleihung des "Adolf-Butenandt-
Stipendiums"

